



**HAL**  
open science

# Modèles intégrés de mécanistique et de résistance en oncopharmacologie-sénescence : *Caenorhabditis elegans* et *Hypsibius dujardini*

Myriam Richaud

► **To cite this version:**

Myriam Richaud. Modèles intégrés de mécanistique et de résistance en oncopharmacologie-sénescence : *Caenorhabditis elegans* et *Hypsibius dujardini*. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONT3517 . tel-01625592

**HAL Id: tel-01625592**

**<https://theses.hal.science/tel-01625592v1>**

Submitted on 27 Oct 2017

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

**Délivré par l'Université de Montpellier**

**Préparée au sein de l'école doctorale CBS2  
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé  
Et de l'unité de recherche UMR 5247 – IBMM  
Institut des Biomolécules Max Mousseron**

**Spécialité : Biologie Santé**

**Présentée par Myriam RICHAUD**

**Modèles intégrés de mécanistique et de  
résistance en oncopharmacologie-  
sénescence : *Caenorhabditis elegans* et  
*Hypsibius dujardini*.**

**Soutenu le 13 décembre 2016 devant le jury composé de**

Mme Laurence VIAN, PU, UM  
Mme Florence SOLARI, CR, INMG  
Mr Stephen BAGHDIGUIAN, Professeur, UM  
Mme Sandrine FRELON, Chercheur, IRSN  
Mme Catherine LECOMTE, Chercheur, IRSN  
Mr Simon GALAS, PU, UM  
Mr Pierre CUQ, PU, UM

Présidente du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse



## Remerciements

*Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon mémoire de thèse.*

*Merci Laurence Vian de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Merci pour votre précieux soutien. Vous avez été là dans tous les moments importants de ma vie à la faculté de pharmacie. Lors de mon recrutement en 2013 tout d'abord, où vous faisiez partie de mon jury de concours. Lors d'un rendez-vous dans votre bureau ensuite, où nous avons discuté du fait de passer une thèse tout en étant adjoint technique à la faculté. C'est vous qui, ce jour-là, avez fait germer l'idée de préparer ce doctorat.*

*Un grand merci à mes deux rapporteurs Florence Solari et Stephen Baghdiguian. Malgré cette fin d'année bien remplie, merci d'avoir pris le temps de juger et critiquer ce travail.*

*Je remercie sincèrement Sandrine Frelon et Catherine Lecomte d'avoir accepté de faire partie de mon jury.*

*Je tiens à adresser mes plus chaleureux remerciements à Simon Galas et Pierre Cuq pour votre encadrement tout au long de mes trois années de thèse.*

*Merci à toi Simon d'avoir accepté de diriger ma thèse et de m'avoir intégré dans l'équipe « Némato ». Tu as été le directeur de thèse idéal. Merci pour tes connaissances illimitées sur Caenorhabditis elegans et ton enthousiasme sans faille à propos de mes « bébés », les tardigrades. Je te remercie pour ton soutien, tes encouragements et ton optimisme. Merci aussi pour ta confiance et l'autonomie que tu m'as laissé. Travailler avec toi a été une formidable expérience qui je l'espère ne fait que commencer.*

*Pierre, merci de m'avoir donné la chance de faire une thèse en étant en poste au laboratoire. Merci également pour ton soutien depuis mon arrivée en 2012 et pour ta participation dans ma rédaction de thèse.*

*Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à ce travail, directement ou non.*

*Merci à Aymeric Bailly et Aurélien Perrin, du CRBM, pour vos précieux conseils et votre expertise en microscopie et imagerie. Grâce à votre aide, nous avons pu obtenir de très belles images de mes tardigrades en fluorescence.*

*Merci également à Carine Chavey, de l'IGMM, pour tes conseils et ta disponibilité lors de mes nombreuses utilisations du Seahorse.*

*Je souhaite également remercier Gérard Cros, Richard Magous et Audrey Schlernitzauer, de l'IBMM, pour m'avoir permis de développer un nouveau projet avec les gaz. Un grand merci à toi Audrey pour ton aide, ta rapidité et ton implication lors des comptages et*

*phénotypages de nos « petits vers ». Je n'aurais pas pu observer jusqu'à 18 000 nématodes (notre record) en une journée sans toi!*

*Merci aussi à Abdelkader Dahmani, Franck Guillem et Hubert Blancou, de S3F Chimie, pour nos échanges sur les aspects chimiques des gaz. La partie chimie « pure » reste pour moi encore obscure mais nos discussions m'ont permis de mieux comprendre les gaz : synthèse, produits de dégradation,... Merci Abdel pour ta patience et ta réactivité dans la préparation des gaz !*

*Un grand merci à Gilberte Marti-Mestres et Hinda Dabboue pour nos collaborations, notamment sur le projet eau mais également pour celles à venir, je l'espère ! Merci pour vos conseils et vos séances de « coaching » Gilberte. Nos discussions au bâtiment C m'ont beaucoup apporté. Merci Hinda pour ta bonne humeur et ta motivation. Tu es toujours partante, battante et motivée.*

*Merci à toute l'équipe de toxicologie : Alex, Françoise, Julien, Kamel, Laure-Anaïs, Marie-Hélène, Philippe, Yassin. Merci pour votre bonne humeur et votre soutien.*

*Une pensée toute particulière pour Chantal, ma colocataire de bureau et ma « maman » au laboratoire (un peu jeune, je sais)! Merci beaucoup d'avoir été là dans les moments difficiles avant et pendant ma thèse. Merci de savoir me soutenir quand j'en ai besoin et de me changer les idées en me parlant de tout sauf de biologie !*

*Je n'oublie pas non plus les « anciens » du labo sur qui j'ai pu compter pour rire, m'amuser, parfois même râler (nous... jamais !) et qui m'ont abandonné (si si c'est vrai !). Vous me manquez beaucoup Audrey, Chaker, Fidaa et Zahraa !*

*Je remercie aussi ma famille !*

*Merci à ceux qui m'ont permis d'en arriver jusque-là.*

*Merci maman et papa pour votre soutien, votre aide et votre confiance. Merci de m'avoir poussé à faire des études et de m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Merci d'être toujours là pour moi !*

*Un très grand merci à José, sans toi je ne serais sans doute jamais arrivée au bout de cette thèse en 3 ans. Tu as été d'un soutien énorme. Merci de m'avoir supporté tout au long de ce projet. Merci aussi pour ton aide en retouche photos et en logos clipart! Love u.*

*Un énorme merci à mes deux amours Enzo et Ethan. Vous êtes ce que j'ai de plus précieux. Merci de m'avoir permis de finir cette thèse, d'être venu avec moi au labo pour compter mes « petites bêtes » et de m'avoir même parfois aidé. J'espère que le stress de la fin de thèse n'a pas été trop pénible pour vous. Je vous promets, les études c'est fini. Maintenant, c'est à vous ! Je vous aime mes loulous !*

*Et pour finir, merci aux très nombreux nématodes et tardigrades qui ont participé à mes travaux.*

*Merci à vous tous ainsi qu'à ceux que j'ai pu oublier de citer !*

## ***Table des matières***

Glossaire .....	19
Abréviations.....	23
Conventions .....	25
INTRODUCTION GENERALE .....	27
PARTIE I : LE MODELE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS .....	33
I - ETAT DES CONNAISSANCES.....	35
1.    Ecologie de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	37
2.    Anatomie et mode de reproduction de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	37
3.    Cycle de vie .....	38
3.1 – Phase embryonnaire .....	40
3.2 – Phase post-embryonnaire .....	40
3.3 – Formes de résistance.....	40
3.3.1 – Stade dauer .....	40
3.3.2 – Diapause de la reproduction et bagging.....	41
4.    Mutants de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	41
5.    Culture de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	46
5.1 – Conditions de culture.....	46
5.2 – Synchronisation et transfert des individus .....	46
5.2.1 – Repiquage .....	47
5.2.2 – Synchronisation ou bleach.....	47
II - ETUDE SUR LES GAZ .....	49

1.	Introduction .....	53
1.1	– Propriétés et utilisation du gaz SF6 dans l'industrie électrique .....	53
1.1.1	– Propriétés du gaz SF6 .....	53
1.1.2	– Produits de décomposition par l'arc électrique .....	54
1.1.3	– Autres utilisations du gaz SF6.....	55
1.2	– Effet de serre .....	55
1.3	– Réduction et remplacement du SF6 .....	56
2.	Matériels et méthodes .....	58
2.1	– Mesures de la toxicité aigüe .....	58
2.2	– Fertilité / Mutagénicité .....	59
2.3	– Cancérogénicité .....	60
2.4	– Gaz et mélanges de gaz étudiés .....	60
2.4.1	– Gaz X .....	61
2.4.2	– Gaz Y .....	61
2.4.3	– Gaz Z.....	61
2.4.4	– Autres gaz .....	62
2.5	– Dosage des composés fluorés par RMN 19F .....	62
3.	Résultats .....	64
3.1	– Etude sur le gaz X.....	64
3.1.1	– Exposition au gaz après échauffement fermeture à 100 000 ppmv .....	64
3.1.2	– Exposition au gaz après échauffement fermeture à 160 000 ppmv .....	64
3.1.3	– Exposition au gaz pur à 20 000 ppmv .....	65
3.1.4	– Exposition au gaz pur à 32 000 ppmv .....	65

3.1.5 – Exposition au gaz pur à 26 000 ppmv .....	66
3.2 – Etude sur le gaz Y .....	68
3.3 – Etude sur le gaz Z .....	69
3.3.1 – Exposition au gaz pur à 15 000 ppmv .....	70
3.3.2 – Exposition au gaz pur à 5 000 ppmv .....	71
3.3.3 – Exposition au gaz pur à 30 000 ppmv .....	71
3.3.4 – Exposition au gaz après coupure à 2 000 ppmv .....	72
3.4 – Etude sur les autres gaz.....	73
3.4.1 – Gaz HFP à 150 ppmv .....	73
3.4.2 – Gaz SF6 à 100 000 ppmv .....	74
3.5 – Dosage des composés fluorés par RMN 19F .....	75
4. Discussion et conclusion .....	76
III - ETUDE SUR LA RESPIRATION SEAHORSE .....	81
1. Introduction .....	83
2. Matériels et méthodes .....	85
2.1 – Culture de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	85
2.2 – Préparation des échantillons .....	85
2.2.1 – Seahorse workflow .....	85
2.2.2 – Analyse des résultats.....	86
3. Résultats et discussion.....	87
PARTIE II : LE MODELE TARDIGRADE HYPHOSIBIUS DUJARDINI.....	89
I - ETAT DES CONNAISSANCES.....	91
1. Les tardigrades et l'espèce <i>Hypsibius dujardini</i> .....	93

1.1 – Phylogénie .....	93
1.2 – Taxonomie .....	94
1.3 – Ecologie .....	95
1.4 – L'espèce <i>Hypsibius dujardini</i> .....	95
1.5 – Anatomie.....	95
1.6 – Reproduction et génétique .....	97
1.7 – Cycle de vie .....	98
1.8 – Forme de résistance.....	99
1.9 – Résistance des tardigrades.....	100
1.10 – Mécanismes de résistance.....	101
1.11 – Maintenance et conditions de culture d' <i>Hypsibius dujardini</i> .....	102
2. Métabolisme.....	103
2.1 – Métabolisme des tardigrades .....	103
2.2 – Mesure du métabolisme / Seahorse XFe24 Analyser .....	103
2.2.1 – Mesures du métabolisme sur les tardigrades.....	103
2.2.2 – Le Seahorse XFe24 Analyser .....	104
2.3 Observation des mitochondries / Mitotracker.....	104
II – MATERIELS ET METHODES & RESULTATS .....	109
Publication.....	111
III – DISCUSSION.....	151
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	161
ANNEXES .....	177



PORTEFEUILLE DE COMPETENCES ET VALORISATION SCIENTIFIQUE DE LA  
THESE .....183

## **Table des figures**

<i>Figure 1 : Cycle de vie de Caenorhabditis elegans (souche N2) à 22°C d'après Altun et Hall, 2009, extrait du Wormatlas.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 2 : Différentes phases du développement de Caenorhabditis elegans d'après Corsi et al., 2015, extrait du Wormbook.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 3 : Différentes réponses des Caenorhabditis elegans à une restriction calorique d'après Angelo et Van Gilst, 2009.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 4 : Positionnement des mutants mitochondriaux sur la chaîne respiratoire mitochondriale d'après Morgan et al., 2007, extrait du WormBook. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 5 : Schéma de la voie DAF-2 / DAF-16 d'après Ewbank, 2006 extrait du WormBook.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 6 : Formule chimique du gaz SF6.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 7 : Répartition globale des gaz à effet de serre d'après l'Agence Internationale de l'Energie (2012) .....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 8 : Répartition des différentes sources de gaz fluorés d'après l'évaluation de 2010 du Groupe d'Evaluation Scientifique, PNUE.....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 9 : Photos des nématodes exposés au gaz pur à 32000 ppmv (A) et des témoins (B), en sortie de réacteur, au terme des quatre heures d'exposition.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 10 : Photos des nématodes exposés au gaz pur à 26000 ppmv (A) et des témoins (B), en sortie de réacteur, au terme des quatre heures d'exposition.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 11 : Nombre moyen de descendants par individu lors des différentes expositions au gaz X .....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 12 : Nombre moyen de descendants par individu lors de l'exposition au gaz Y .....</i>	<i>69</i>

<i>Figure 13 : Nombre moyen de descendants par individu lors des différentes expositions au gaz Z.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 14 : Nombre moyen de descendants par individu lors des expositions aux autres gaz.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 15 : Principe du test de Ames.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 16 : Mécanisme hormétique (Zimmermann et al., 2014) .....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 17 : Présentation du Seahorse workflow .....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 18 : Consommation relative en oxygène des différentes souches étudiées ..</i>	<i>88</i>
<i>Figure 19 : Position des Tardigrades dans « the Tree of Life » (Dunn et al., 2008)..</i>	<i>94</i>
<i>Figure 20 : Phylogénie des Ecdysozoa (Borner et al., 2014).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 21 : Image d'un tardigrade Hypsibius dujardini en Nomarski (photo réalisée avec un microscope confocal SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany) .....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 22 : Coupe transversale d'un tardigrade femelle (Miller, 2011) .....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 23 : Image d'une mue d'Hypsibius dujardini en Nomarski (photo réalisée avec un microscope confocal SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany).....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 24 : Image d'embryons d'Hypsibius dujardini dans une mue en Nomarski (photo réalisée avec un microscope confocal SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany)</i>	<i>98</i>
<i>Figure 25 : Cycle de vie d'H. dujardini d'après Gabriel et al., 2007. ....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 26 : Etats de résistance des tardigrades (Miller, 2011).....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 27 : Formule chimique Mitotracker Red CMXRos.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 28 : Spectre de fluorescence Mitotracker Red CMXRos .....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 29 : Formule chimique Mitotracker Green FM .....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 30 : Spectre de fluorescence Mitotracker Green FM .....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 31 : Formule chimique H2DCFDA .....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 32 : Spectre de fluorescence H2DCFDA .....</i>	<i>107</i>

*Figure 33 : Perspectives et projets à venir sur le modèle nématode ..... 158*

*Figure 34 : Perspectives et projets à venir sur le modèle tardigrade ..... 160*

## **Liste des tableaux**

<i>Tableau 1 : Temps de développement de la souche de Caenorhabditis elegans N2 à différentes températures d'après Byerly et al., 1976. ....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 2 : Composition du milieu NGM-Agar pour 1 litre .....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 3 : Toxicité, mutagénicité et cancérogénicité du gaz X.....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 4 : Toxicité et mutagénicité du gaz Y.....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 5 : Toxicité, mutagénicité et cancérogénicité du gaz Z.....</i>	<i>72</i>
<i>Tableau 6 : Toxicité et mutagénicité des autres gaz.....</i>	<i>74</i>
<i>Tableau 7 : Présentation des effectifs, de la mesure des OCR par individus et de sa mesure relative par rapport à la souche N2 pour chacune des souches de Caenorhabditis elegans.....</i>	<i>88</i>

## **Glossaire**

### **A**

**Acide Désoxyribonucléique (ADN) :** Constituant essentiel des chromosomes et support moléculaire de l'information génétique.

**Anhydrobiose :** État de suspension temporaire des activités vitales permettant à un organisme de supporter une forte et longue dessiccation.

**Anoxybiose :** État de suspension temporaire des activités vitales permettant à un organisme de supporter un manque d'oxygène extrême.

### **C**

**Cancérogène :** Substance ou agent extérieur à l'organisme qui, à petite ou forte dose, sur une durée variable, provoque un cancer chez les êtres vivants.

**Concentration létale x (CL<sub>x</sub>) :** Dose d'exposition à un composé induisant x% de mortalité.

**Cryobiose :** État de suspension temporaire des activités vitales permettant à un organisme de supporter un froid intense.

### **D**

**Dauer :** Stade de développement alternatif des nématodes, résistant à des conditions environnementales défavorables.

**Diapause :** Arrêt temporaire d'activité et de développement.

**Diploïde :** Un individu est diploïde (du grec diploos, double et eidos, en forme de) lorsque ses chromosomes sont présents par paires (2n chromosomes).

### **E**

**Enkystement :** Mode de défense de certains organismes contre les conditions défavorables du milieu, consistant à sécréter une gangue dure dans laquelle ils restent à l'état de vie latente.

**Epigénétique :** L'épigénétique correspond au domaine se focalisant sur toutes les modifications ou facteurs génétiques qui ne sont pas codées directement par la séquence d'ADN. Elle régule l'activité des gènes en facilitant ou en empêchant leur expression. Elle est fondamentale car elle permet une lecture différente d'un même code génétique. Elle explique par exemple les différences existant chez des vrais jumeaux.

## G

**Gaz à effet de serre (GES) :** Les gaz à effet de serre sont des composants gazeux qui absorbent le rayonnement infrarouge émis par la surface terrestre et contribuent à l'effet de serre. L'augmentation de leur concentration dans l'atmosphère est l'un des facteurs d'impact à l'origine du récent réchauffement climatique.

**Génome :** Le génome est l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce codé dans son ADN. Il contient en particulier toutes les séquences codantes (transcrites en ARN messagers et traduites en protéines) et non codantes (non transcrites ou transcrites en ARN, mais non traduites).

## H

**Hermaphrodite :** L'hermaphrodisme désigne un phénomène biologique dans lequel l'individu est morphologiquement mâle et femelle. Les *C. elegans* hermaphrodites se reproduisent par auto-fertilisation.

Mécanisme **Hormétique :** L'hormèse désigne une réponse de stimulation des défenses biologiques, généralement favorable, à des expositions de faibles doses de toxines ou d'autres agents générateurs de stress. À cause de ce mécanisme, un agent polluant ou toxique peut avoir un effet opposé suivant que la dose reçue est faible ou forte.

## I

**Invalidation génique :** En biologie moléculaire, le knock-out (knockout ou KO), en français « invalidation génique », est l'inactivation totale d'un gène.

## M

**Modèle :** Un modèle est une représentation schématique d'un objet ou d'un processus qui permet de substituer un système plus simple au système naturel.

**Mutagène :** Un mutagène est un agent qui change le génome (en général l'ADN) d'un organisme et élève ainsi le nombre de mutations génétiques au-dessus de son seuil normal.

**Mutagénèse :** La mutagénèse est le processus d'apparition d'une mutation. Il peut être naturel, aléatoire ou artificiel par exposition de l'ADN à un « agent mutagène ». Ce processus peut être à l'origine de cancer, de maladies héréditaires et est le principal responsable de la biodiversité des espèces.

## N

**Nematode Growth Medium (NGM) :** Milieu de culture des nématodes.

## O

**Osmobiose** : État de suspension temporaire des activités vitales permettant à un organisme de supporter un degré de salinité extrême.

## P

**Parthénogénèse** : La parthénogénèse est un mode de reproduction indépendant de toute sexualité permettant le développement d'un individu à partir d'un ovule non fécondé.

**Phylogénie** : La phylogénie correspond à l'étude des liens existant entre espèces apparentées. Grâce à elle, il est possible de retracer les principales étapes de l'évolution des organismes depuis un ancêtre commun et ainsi de classer plus précisément les relations de parentés entre les êtres vivants.

## Q

**Quiescence** : Arrêt de développement en cas de conditions extérieures défavorables.

## R

**Reproduction sexuée** : La reproduction sexuée est assurée par la fécondation, c'est-à-dire par fusion des gamètes mâle et femelle donnant un œuf (ou zygote). Elle implique la participation de deux organismes parentaux de même espèce, de sexes différents.

## T

**Taxonomie** : La taxonomie est une science, branche de la biologie, qui a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier puis les nommer et enfin les classer et de les reconnaître via des clés de détermination dichotomiques.

**Toxicité aiguë** : La toxicité aiguë est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive d'un produit toxique. Une façon de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale 50. Lorsqu'il s'agit d'un toxique qui est inhalé, on parle de concentration létale 50. A contrario, la toxicité chronique est induite par une exposition chronique, sur le long terme. Son étude dure plusieurs mois ou années et suppose l'administration de plus d'une dose à des intervalles variant selon la méthode employée.

**Toxique** : Produit ou substance nocif pour l'organisme.



## **Abréviations**

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNi (en : RNAi)	ARN interference
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CEI	Commission Electrotechnique Internationale
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	Caenorhabditis Genetics Center
CL <sub>50</sub>	Concentration Létale médiane
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DIC	Differential Interference Contrast – Microscope à contraste interférentiel
DL <sub>50</sub>	Dose Létale médiane
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO d6	Diméthylsulfoxyde deutéré
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>
ECAR	ExtraCellular Acidification Rate – Taux d'acidification extracellulaire
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethyl MethaneSulfonate
GPa	Giga Pascal
GWP	Global Warming Potential – Potentiel de réchauffement global
Gy	Gray
<i>H. dujardini</i>	<i>Hypsibius dujardini</i>
HFP	Hexafluoropropène
Hpl	Hours post laying
ISO	International Organization for Standardization – Organisation internationale de normalisation
J7	Jour 7
kJ	KiloJoule
Mb	Megabase
<i>M. hufelandi</i>	<i>Macrobiotus hufelandi</i>

<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
<i>M. tardigradum</i>	<i>Milnesium tardigradum</i>
NGM	Nematode Growth Medium – Milieu de culture des nématodes
O <sub>2</sub>	Oxygène
OCR	Oxygen Rate Consumption – Taux de consommation d'oxygène
pb	Paire de bases
pmol/min	Pico mole par minute
ppmv	Parties par millions en volume
PRG	Potentiel de Réchauffement Global
Respal	Air respirable
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species – Espèces réactives de l'oxygène
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SF6	Hexafluorure de soufre
UV	UltraViolet
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
<i>X. tropicalis</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>

## Conventions

Selon les règles de l'ICZN (International Commission on Zoological Nomenclature), les différents taxons portent une majuscule au début de leur nom.

Ex : *Nematoda*, *Tardigrada*

Les noms d'espèces, indiqués en latin, correspondent à ceux de la nomenclature binomiale et sont notés en italique.

Ex : *Caenorhabditis elegans*, *Hypsibius dujardini*

Concernant le nématode *Caenorhabditis elegans*, une nomenclature génétique précise existe. Elle est basée sur la proposition d'Horvitz et al en 1979.

Les gènes de *C. elegans* sont désignés par trois lettres minuscules suivies d'un tiret et d'un chiffre. L'ensemble est noté en italique.

Ces trois lettres se réfèrent soit :

- à la nature du gène.

Ex : Superoxyde dismutase dans le cas de *sod-3*

- au phénotype observé lorsque le gène est muté.

Ex : *unc* (uncoordinated), *dpy* (dumpy), *let* (lethal)

Les produits géniques sont désignés par les trois lettres du gène en majuscule.

Ex : SLO-1, UNC-13

Les mutants portent le nom du gène muté.

Ex : les mutants *egl-19* portent une mutation dans le gène *egl-19*.

# ***INTRODUCTION GENERALE***

Un modèle est « une représentation schématique d'un objet ou d'un processus qui permet de substituer un système plus simple au système naturel » (Encyclopédie universalis).

Comme les autres sciences naturelles, la biologie a longtemps été une science descriptive. Le biologiste s'attachait à observer, classer et comparer. Dans un second temps, pour expliquer les phénomènes qu'il observait, il a cherché à les rapprocher de systèmes similaires mais dont les lois étaient mieux connues ou de systèmes plus simples (Boudon et al., 2016).

Actuellement, en biologie, des modèles sont nécessaires afin de comprendre le fonctionnement des organismes vivants, l'évolution des espèces ou pour tester de nouveaux traitements par exemple.

La culture de cellules est la méthode préférée du biologiste cellulaire, essentiellement de par sa facilité d'utilisation. Cependant, les cellules en culture perdent certaines de leurs propriétés et en acquièrent d'autres (Bobinnec, 2003). De plus, les cultures cellulaires ne peuvent être considérées comme un organisme entier. Elles ne sont qu'un type cellulaire isolé, une petite partie d'un tissu, d'un organe et à fortiori d'un organisme. Les conditions de culture fournissent donc des résultats très intéressants mais qui ne peuvent pas toujours être extrapolés à des conditions plus complexes. Les biologistes ont donc dû faire appel à d'autres modèles pour résoudre leurs questions scientifiques.

La problématique est alors apparue du choix du modèle. Tout d'abord, celui-ci doit être adapté à l'élevage en laboratoire à un coût acceptable. Ensuite, en fonction des objectifs scientifiques, d'autres critères vont apparaître tels que la vitesse de reproduction, la possibilité d'étudier le comportement, la simplicité d'analyse génétique,... Aujourd'hui, il existe une vingtaine de modèles de référence.

Le modèle murin avec la souris constitue un modèle de choix pour l'étude des maladies humaines. Pour leurs recherches biomédicales, les scientifiques ont développé des modèles en sélectionnant spécifiquement des souris présentant certains caractères. Ils utilisent des souches simulant des désordres génétiques afin d'étudier leur développement et de tester de nouvelles thérapies. Le génome de *Mus musculus* a été publié en 2002 (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Il fait approximativement 3 500 millions de pb de long et contient 23 000 gènes codants des protéines. *M. musculus* n'est pas le mammifère le plus proche de l'Homme mais l'un des plus petits. Son cycle de reproduction est parmi les plus rapides. Son élevage est assez aisé bien que le coût d'une animalerie reste souvent conséquent. La souris a une durée de vie courte. Une année pour elle équivaut à 30 ans pour l'Homme. Ce modèle permet l'analyse génétique via l'inactivation sélective de certains gènes. Cependant, son développement embryonnaire est interne, ce qui empêche certains types d'études. De plus, l'utilisation des animaux à des fins scientifiques est soumise à un encadrement réglementaire très strict dont d'autres modèles alternatifs sont affranchis.

La plupart de nos connaissances de développement des vertébrés proviennent des grenouilles *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*. Originaires d'Afrique, les xénopes sont faciles à élever en laboratoire. Leurs œufs sont intéressants car particulièrement volumineux et faciles à injecter. Ces grenouilles, au cours de leur vie, peuvent produire jusqu'à 1000 œufs pour *X. laevis* et 3000 œufs pour *X. tropicalis*.

Cependant, ils sont opaques au microscope, ce qui rend leur étude difficile. De plus, la maturation des œufs est très longue (10 à 12 mois). Ce modèle, peu utilisé en génétique est ainsi utile pour les études de biochimie.

La drosophile est l'un des organismes modèles les mieux connus et sûrement le plus utilisé. Thomas Hunt Morgan l'adopta comme système expérimental dès 1909. La génétique moderne repose sur la base de ses travaux. *Drosophila melanogaster* est un modèle expérimental très intéressant pour les biologistes et plus particulièrement pour les généticiens. Il existe de nombreuses mutations génétiques visibles, comme de nombreuses couleurs d'yeux. Cette mouche de 2 à 3 mm de long a un cycle de développement très rapide (environ 15 jours). Les femelles vivent un mois à température ambiante mais cette durée peut augmenter à plus de deux mois à des températures plus basses. Une femelle peut pondre 30 à 50 œufs par jour durant toute sa vie. Son génome complet a été publié en 2000 (Adams et al., 2000). Il fait 168 736 537 pb de long et contient 13 937 gènes codant les protéines. 75% des gènes impliqués dans les maladies humaines sont retrouvés chez *D. melanogaster*.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un système simple. Il s'agit d'un organisme unicellulaire. Le génome complet de cette levure a été publié en 1996 (Goffeau et al., 1996). Il fait 12 157 105 pb de longueur et contient 6 692 gènes. Son étude a contribué de façon notable à une meilleure compréhension de nombreux aspects en biologie cellulaire et moléculaire. Elle a permis aux scientifiques de mettre en avant les relations entre gènes et protéines et leurs fonctions dans les cellules. Les avantages de ce modèle sont multiples. Il s'agit d'organismes eucaryotes. Comme l'Homme, leurs cellules ont un noyau contenant de l'ADN sous forme de chromosomes. Leurs cellules ont des propriétés biologiques proches des nôtres. Les manipulations génétiques sur ce modèle sont simples et peu coûteuses. 20% des gènes humains connus pour jouer un rôle dans les maladies ont un équivalent chez *S. cerevisiae*.

Depuis les années 1960, le Zebrafish (*Danio rerio*) est devenu de plus en plus utilisé pour les recherches scientifiques. C'est un poisson tropical natif d'Asie du sud. Il fait 2,5 à 4 cm de long. A son stade larvaire, il est transparent puis développe des stries et une couleur bleue en devenant adulte. Les zebrafish ont été utilisés pour étudier les dystrophies musculaires par exemple et sont d'importants modèles pour comprendre les mécanismes du développement et des maladies comme le cancer. Son génome complet a été publié en 2013 (Howe et al., 2013). Il fait 1 505 581 940 pb de long et contient 26 247 gènes codants protéines. *D. rerio* est petit et robuste. Il grossit très rapidement et se développe autant en un jour qu'un embryon humain en un mois. Ses embryons sont transparents, ce qui permet aux scientifiques d'étudier leur développement interne. Les zebrafish ont une structure génétique similaire à l'Homme, avec qui ils partagent 70% des gènes.

Le modèle *Caenorhabditis elegans* est un système expérimental récent. Il a été introduit en 1965 par Sydney Brenner pour étudier le fonctionnement du système nerveux au sein d'un organisme simple. Ce ver peut être cultivé sur boîte de pétri. Ses œufs et ses tissus sont transparents. Son cycle de vie est de 3 semaines à température ambiante. Dans sa vie, un hermaphrodite pond jusqu'à 300 œufs. Le lignage cellulaire de cette espèce est invariant. L'hermaphrodite possède exactement 959 cellules. *C. elegans* partage avec l'Homme beaucoup de gènes et de voies

métaboliques. Son génome complet a été publié en 1998 (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Il fait 100 millions de pb de long et contient un nombre de gènes équivalent à celui de l'Homme, environ 20 500. Même si ce modèle est assez simple, la plupart des signaux moléculaires contrôlant son développement sont retrouvés chez des organismes plus complexes comme l'Homme. De nombreux mutants peuvent être créés facilement, permettant l'étude de la fonction des gènes.

Le modèle *C. elegans* a été utilisé dans de très nombreuses études, principalement des études de mécanistique car il permet d'étudier facilement le fonctionnement des gènes et les voies métaboliques. C'est grâce à ce ver que le trio Sydney Brenner, John Sulston et Robert Horvitz ont obtenu en 2002 le prix Nobel de médecine pour leurs découvertes concernant « la régulation génétique de l'organogénèse et de la mort cellulaire programmée ». En 2006, Craig Mello et Andrew Fire ont également obtenu un prix Nobel avec le concours de ce nématode pour leur découverte du phénomène d'interférence par l'ARN. *C. elegans* a été utilisé comme modèle d'étude du vieillissement humain et des maladies associées (Finch et Ruvkun, 2001 ; Olsen et al., 2006) ainsi que d'autres pathologies telles que les maladies mitochondriales (Ventura et al., 2006) et les dystrophies musculaires (Segalat et al., 2005).

Il n'a été utilisé que plus récemment pour des études de toxicité. La norme ISO 10872 :2010 utilise ce nématode pour étudier la toxicité d'échantillons environnementaux. *C. elegans* a également été employé pour une étude sur les effets des gaz anesthésiants (Morgan et al., 2007). Adeline Buisset-Goussen, dans sa thèse en 2014 a étudié les effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants sur cet organisme modèle.

Les modèles biologiques utilisés sont donc nombreux mais aucun n'est parfait, universel. Comme nous venons de le voir, chaque modèle a son utilité dans un certain contexte et présente des limites. C'est avec l'expérience qu'un modèle biologique démontre sa pertinence. Son choix est directement lié à son utilisation et au type de recherche à mettre en œuvre.

L'objectif de mon doctorat était de mettre au point des modèles biologiques pour des études en oncopharmacologie et senescence.

Une stratégie en deux axes a été développée avec l'utilisation et la validation du modèle *C. elegans* d'une part et la mise au point d'un nouveau modèle d'autre part.

Ce manuscrit de thèse se présente donc en deux parties.

La première correspond à l'utilisation du modèle nématode. Après un état des connaissances, elle est divisée en deux sous-parties correspondant à deux projets développés lors de ma thèse.

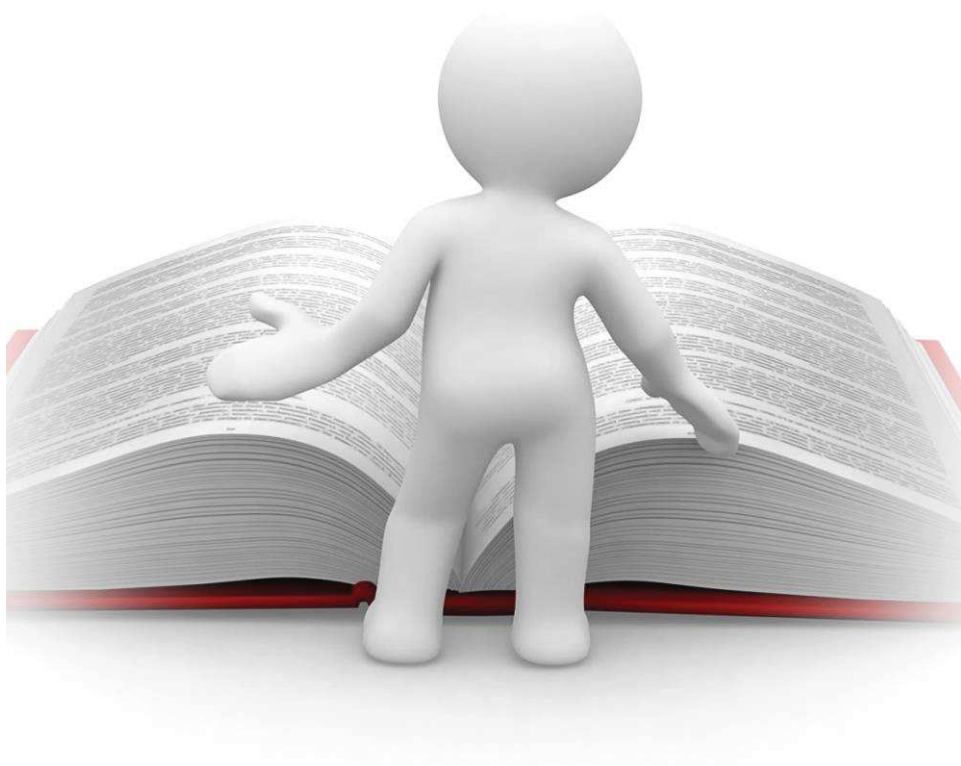
La seconde partie développe la mise au point d'un nouveau modèle : le tardigrade et, plus précisément, l'espèce *Hypsibius dujardini*. Après un état des connaissances, cette partie décrit sous la forme d'un article scientifique le travail réalisé sur ce modèle.

Enfin, dans la troisième partie, l'ensemble des résultats obtenus et la pertinence des modèles sont discutés.

***PARTIE I : LE MODELE NEMATODE  
CAENORHABDITIS ELEGANS***



# ***I - ETAT DES CONNAISSANCES***



Le nématode *Caenorhabditis elegans* est petit et transparent. Depuis sa découverte par Sydney Brenner dans les années 70 (Brenner, 1974), *C. elegans* est devenu un modèle de choix pour les études moléculaires, génétiques et développementales.

Ces cellules sont invariables en nombre et position entre les individus (Sulston et al., 1983 ; Sulston et Horvitz, 1977). Ce nématode est le premier métazoaire à avoir son génome séquencé en totalité (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

L'utilisation de ce modèle a de nombreux avantages : méthode de culture simple, durée de vie courte, reproduction principalement hermaphrodite.

Un grand nombre de ressources disponibles (littérature, publications, génome, mutants) et de nombreuses techniques mises à disposition (RNAi, mutagenèse, transgénèse) font de *C. elegans* un modèle de choix.

## **1. Ecologie de *Caenorhabditis elegans***

Les nématodes sont de petits vers microscopiques (1 mm de long) jouant un rôle essentiel dans le cycle et la dégradation des nutriments de l'environnement. Ce sont des organismes eucaryotes pluricellulaires.

L'écologie de *C. elegans* est devenue un axe d'intérêt majeur. Des études nombreuses ont permis de découvrir de nouvelles souches de *C. elegans* (Andersen et al., 2012) et espèces de *Caenorhabditis* (Kiontke et al., 2011).

*C. elegans* (Metazoa, Nematoda) est un nématode vivant principalement dans les sols. Mais il est également retrouvé dans d'autres habitats tels que matières végétales en décomposition, fleurs, plantes et fruits. Son habitat naturel est donc très variable. C'est un organisme bactériophage non-parasitaire. Cette espèce est cosmopolite, identifiée dans différentes régions du globe (Barriere et Felix, 2005). Ce nématode a été décrit pour la première fois au début du siècle dernier par Maupas (Maupas, 1900). *C. elegans* est capable de se développer dans de larges gammes de températures (8°C à 27°C) (Félix et Braendle, 2010). Son utilisation est réalisée au laboratoire à une température de 20°C. La souche sauvage de *C. elegans* utilisée en routine au laboratoire est la souche N2. Celle-ci a été isolée sur un compost de champignons (Staniland, 1957).

## **2. Anatomie et mode de reproduction de *Caenorhabditis elegans***

Le phylum des nématodes est un groupe zoologique présentant une grande diversité sur le plan de la taille, du mode et du milieu de vie des individus. Cependant, tous les nématodes partagent la même anatomie générale avec :

- un tube externe, composé de la cuticule et de ses tissus associés,
- une cavité pseudocoelomique, avec les tractus digestifs et génitaux.

Cette espèce de nématodes est principalement hermaphrodite (XX) mais il existe également de rares mâles (XY). Le taux de mâles est de 1/1000 en laboratoire et peut varier lors de conditions expérimentales particulières.

### 3. Cycle de vie

Dans les conditions de laboratoire à 20°C, *C. elegans* a un cycle de vie de 3 jours. Des variations de températures peuvent avoir des effets sur le cycle de vie du ver, son taux de ponte et sa fécondité (Byerly et al., 1976) (tableau 1).

Le cycle de vie de *C. elegans* est composé de deux phases : le développement embryonnaire et la phase post-embryonnaire avec différents stades larvaires (figure 1). Ces différentes phases de développement peuvent facilement être observées directement in vivo car *C. elegans* est totalement transparent (figure 2). Cette transparence a permis de décrire précisément les différents stades de vie de l'organisme et d'établir le lignage cellulaire, invariant entre les individus (Brenner, 1974 ; Byerly et al., 1976 ; Sulston et al., 1983). Au stade adulte, les individus possèdent 959 cellules invariables en genres et en nombres entre les individus. *C. elegans* a six paires de chromosomes (cinq paires d'autosomes et une paire de gonosomes) (Araiz et al., 2008).

Tableau 1 : Temps de développement de la souche de *Caenorhabditis elegans* N2 à différentes températures d'après Byerly et al., 1976.

	"16°C" (16.0 ± 0.3°C)	"20°C" (19.5 ± 0.5°C)	"25°C" (25.0 ± 0.2°C)
Ponte	0 h	0 h	0 h
Eclosion	16-18 h	10-12 h	8-9 h
Première mue	36.5 h	26 h	18 h
Deuxième mue	48 h	34.5 h	25.5 h
Troisième mue	60.0 h	43.5 h	31 h
Quatrième mue	75 h	56 h	39 h
Début de ponte	~ 90 h	~ 65 h	~ 47 h
Maximum de ponte	~ 140 h	~ 96 h	~ 62 h
Fin de ponte	~ 180 h	~ 128 h	~ 88 h
Dimension première mue	360 µm	370 µm	380 µm
Dimension deuxième mue	490 µm	480 µm	510 µm
Dimension troisième mue	650 µm	640 µm	620 µm
Dimension quatrième mue	900 µm	850 µm	940 µm
Dimension début de la ponte	1150 µm	1060 µm	1110 µm
Taux maximum de ponte	5.4/h	9.1/h	8.1/h
Nombre d'œufs pondus total	275	280	170

Figure 1 : Cycle de vie de *Caenorhabditis elegans* (souche N2) à 22°C d'après Altun et Hall, 2009, extrait du *Wormatlas*.

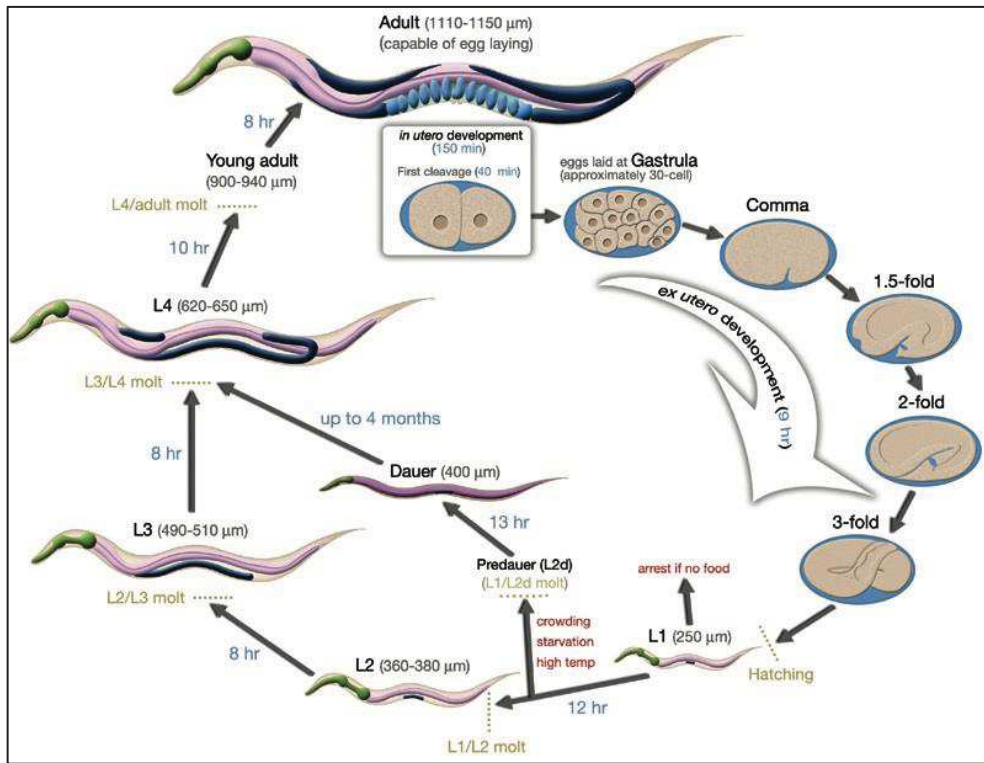
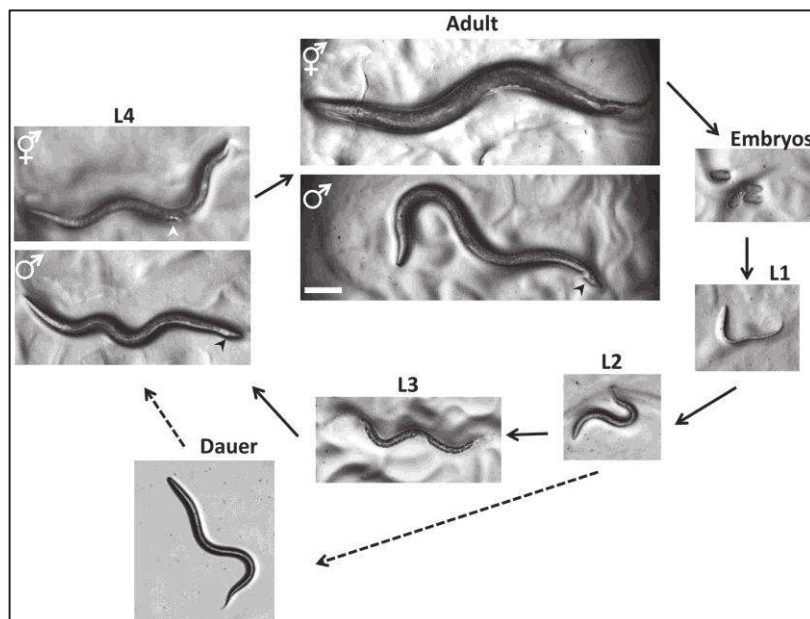


Figure 2 : Différentes phases du développement de *Caenorhabditis elegans* d'après Corsi et al., 2015, extrait du *Wormbook*.



### **3.1 – Phase embryonnaire**

La phase embryonnaire se déroule en deux étapes : une prolifération cellulaire puis une phase d'organogénèse et de morphogénèse. La prolifération cellulaire a lieu immédiatement après la fertilisation de l'oocyte *in utero* et produit 550 cellules principalement indifférenciées. A la fin de cette phase, l'embryon est sphéroïde et possède trois feuillets ou couches : ectoderme, mésoderme et endoderme. La deuxième étape avec l'organogénèse et la morphogénèse ne consiste qu'en une différenciation cellulaire. L'embryon grossit, triple de volume et prend sa forme définitive avec tous ses tissus et organes différenciés. A la fin de cette étape, la larve est visible et bouge à l'intérieur de l'œuf. L'œuf va ensuite éclore et la larve va entrer dans la seconde phase de son cycle de développement, la phase post-embryonnaire, si la nourriture est présente (Altun et Hall, 2009).

### **3.2 – Phase post-embryonnaire**

Le développement embryonnaire est composé de quatre stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) avant d'atteindre le stade adulte (figure 1&2). Ces quatre stades sont séparés par des mues. Durant les différents stades larvaires, *C. elegans* va grandir significativement. Il va ainsi passer de 250 µm au stade L1 à 1200 µm au stade adulte.

### **3.3 – Formes de résistance**

Des variations environnementales peuvent modifier la durée de vie ou les réponses développementales chez *C. elegans*. Quand ils rencontrent des conditions difficiles, les individus peuvent ainsi ralentir ou arrêter leur développement de plusieurs manières décrites ci-dessous :

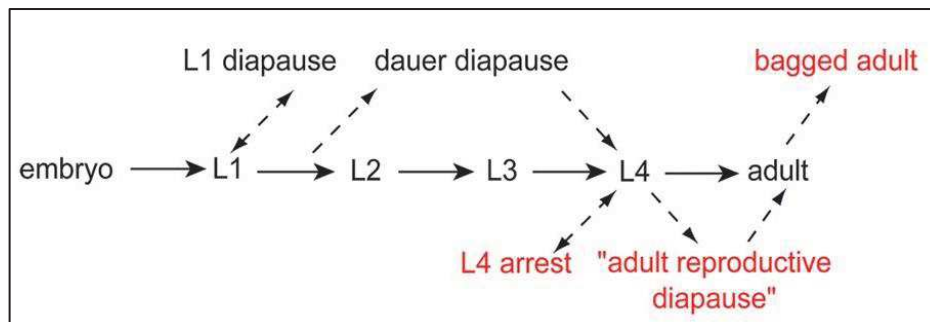
#### **3.3.1 – Stade dauer**

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, problème de température trop élevée, trop forte densité de population, manque de nourriture (Golden et Riddle, 1984), *C. elegans* entre dans un stade de résistance qui est appelé le stade dauer. Celui-ci peut durer plusieurs mois. Le passage à ce stade se fait à la fin du stade L1. Il passe par la formation d'une larve appelée pré-dauer (L2d) (figure 1, 2 & 3). Si les conditions environnementales redeviennent favorables, la larve L2d va reprendre un cycle normal et atteindre le stade L3 (Altun et Hall, 2009). Si au contraire les conditions restent défavorables, la larve passe au stade dauer (figure 1 & 2).

Ce stade présente des caractéristiques morphologiques et physiologiques très particulières. La larve dauer est incapable de se nourrir. En effet, sa cavité buccale va rétrécir jusqu'à se fermer (Cassada et Russell, 1975 ; Félix et Braendle, 2010 ; Riddle, 1988). Sa cuticule va s'élargir (Wolkow et Hall, 2011). Cette forme de résistance peut ainsi permettre au dauer de survivre plusieurs mois en attendant des

conditions environnementales plus favorables. Il pourra alors reprendre son cycle au stade L4 (Altun et Hall, 2009).

Figure 3 : Différentes réponses des *Caenorhabditis elegans* à une restriction calorique d'après Angelo et Van Gilst, 2009.



### 3.3.2 – Diapause de la reproduction et bagging

Lorsque les nématodes sont privés de nourriture au stade L4 (restriction calorique), soit ils arrêtent leur cycle cellulaire à ce stade, soit ils entrent en diapause, bloquant leur processus de reproduction (Angelo et Van Gilst, 2009 et figure 3).

Par contre, lorsque cette privation de nourriture intervient au stade L4 tardif ou pendant leur stade adulte, on observe un phénomène de rétention des embryons appelé bagging (Chen et Caswell-Chen, 2004) (figure 3). Les embryons vont éclore et se développer dans le corps de l'adulte.

## 4. Mutants de *Caenorhabditis elegans*

Les nématodes sont très homogènes en termes de forme, activité et temps de développement. Comme vu précédemment, le nombre de leurs cellules est constant et invariable en nombre et position entre les individus. Leur cycle de développement est lui aussi reproductible d'un individu à l'autre. De nombreux mutants ont ainsi pu être isolés sur la base de leurs phénotypes. Des modifications flagrantes ont rapidement été mises en évidence : défauts locomoteurs (unc : uncoordinated), tailles aberrantes (sma : small ou lon : long), rythme de ponte anormal (egl : egg laying defective),...

La facilité de mutagenèse et le criblage facile chez cet organisme font qu'un mutant de *C. elegans* existe pour chaque gène.

Le CGC (*Caenorhabditis* genetic center, Université du Minnesota) collecte, maintient et distribue les souches stock de *C. elegans* partout dans le monde.

Ainsi, n'importe quel laboratoire travaillant sur ce nématode peut commander et étudier sur la même souche standardisée et clairement identifiée de vers.

Pour nos études, différentes souches de nématodes ont été utilisées. Elles proviennent toutes du CGC.

- **Souche N2 :**

Il s'agit de la souche sauvage de référence. Elle a été isolée d'un compost de champignons à côté de Bristol, en Angleterre, par L. N. Staniland en 1957. Cette souche N2 a été fournie au CGC en 1993 par Hodgkin J, Université d'Oxford, Oxford, Angleterre.

- **Souche *glp-1(or178)* :**

*glp-1* : abnormal Germ Line Proliferation

Souche CGC EU552

*glp-1* code pour une famille de récepteurs LIN-12/Notch qui modère la mitose/méiose dans la lignée germinale de *C. elegans*. Ce nématode *glp-1* est sensible à la température. Il est stérile à 25°C.

Cette souche a été obtenue par mutagénèse avec l'EMS (Ethyl MéthaneSulfonate) par Danielle Hamill.

Elle a été fournie au CGC en 1998 par Bowerman B, Université d'Oregon, Eugene, États-Unis.

- **Souche *mev-1(kn1)* :**

*mev-1* : abnormal MEthyl Viologen sensitivity

Souche CGC TK22

Il s'agit d'un mutant du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 4). *mev-1* encode l'orthologue chez *C. elegans* de la succinate déshydrogénase cytochrome b560, une protéine membranaire qui appartient au complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. MEV-1 est nécessaire pour la phosphorylation oxydative et les mutations de *mev-1* entraînent un métabolisme énergétique anormal et une augmentation de la sensibilité au stress oxydant et aux pathogènes. Ces nématodes *mev-1* sont sensibles au méthyl viologène (paraquat) et à l'oxygène. Leur durée de vie est courte par rapport à la souche sauvage.

Cette souche a été obtenue par mutagénèse avec l'EMS par N. Ishii et al. en 1990.

Elle a été fournie au CGC en 1990 par Ishii N, Université de Médecine de Tokai, Kanagawa, Japon.

- **Souche *clk-1(qm30)* :**

*clk-1* : CLoCK (biological timing) abnormality

Souche CGC MQ130

Il s'agit d'un mutant de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 4).

*clk-1* code pour l'orthologue chez *C. elegans* de COQ7/CAT5, une déméthoxy-ubiquinone hydroxylase très conservée qui est nécessaire à la biosynthèse de l'ubiquinone (Coenzyme Q, Q9) par la 5-déméthoxyubiquinone. CLK-1 est nécessaire chez le nématode pour avoir une croissance, un développement, une senescence et un nombre de descendants normaux. Cette souche de nématodes *clk-1* a une croissance lente.

Elle a été obtenue par mutagenèse avec l'EMS par P. Boutis (Wong et al., 1995).

Cette souche a été fournie au CGC en 1995 par Hekimi S, Université McGill, Montréal, Canada.

- **Souche *isp-1(qm150)* :**

*isp-1* : Iron-Sulfur Protein

Souche CGC MQ887

Il s'agit d'un mutant du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 4).

*isp-1* code pour une protéine Rieske Iron Sulphur qui est une sous-unité du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le complexe III catalyse le transport des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Les mutants *isp-1* consomment moins d'oxygène, ont une sensibilité diminuée aux ROS et une augmentation de leur longévité. Ces nématodes ont un développement et un comportement lents.

Cette souche a été obtenue par mutagenèse avec l'EMS par Jin Liu Feng (Feng et al., 2001).

Elle a été fournie au CGC en 2002 par Hekimi S, Université McGill, Montréal, Canada.

- **Souche *aak2(ok524)* :**

*aak-2* : AMP-Activated Kinase

Souche CGC RB754

*aak-2* code un des deux homologues de la sous unité alpha catalytique de la protéine kinase AMP-activatrice. Chez *C. elegans*, *aak-2* agit sur la résistance aux stress environnementaux, le niveau énergétique (ratio AMP/ATP) et régule *daf-2*, régulant la durée de vie des adultes. *aak-2* agit en parallèle avec *daf-16 / FOXO*.



Ce nématode a été produit par invalidation génique (knock-out) par les UV et la température dans le cadre du projet OMRF par le *C. elegans Gene Knockout Consortium*.

Cette souche a été fournie au CGC en 2002 par Barstead R, Fondation de Recherche Médicale d'Oklahoma, Oklahoma City, États-Unis.

- **Souche *daf-16(mu86)* :**

*daf-16* : abnormal Dauer Formation

Souche CGC CF1038

*daf-16* code l'homologue *C. elegans* de forkhead box O (FOXO) (figure 5). DAF-16 fonctionne comme un facteur de transcription qui agit sur la voie insuline / IGF1, régulant la formation de dauer, la longévité, le métabolisme des graisses, la réponse au stress et l'immunité. Cette souche *daf-16* ne peut entrer en stade dauer. Sa durée de vie est courte.

Elle a été obtenue par *C. kenyon* par la température et les UV (Kenyon et al., 1993). Cette souche a été fournie au CGC en 2000 par Kenyon C, Université de Californie, San Francisco, États-Unis.

La souche de bactérie *E. coli* utilisée comme source de nourriture pour les nématodes provient elle aussi du CGC.

- **Souche *E. coli* HT115(DE3) :**

Souche CGC GC363

Cette souche a été obtenue par Killian et Hubbard.

Elle a été fournie au CGC en 2001 par Hubbard J, Université de New York, New York, États-Unis.

Figure 4 : Positionnement des mutants mitochondriaux sur la chaîne respiratoire mitochondriale d'après Morgan et al., 2007, extrait du *WormBook*.

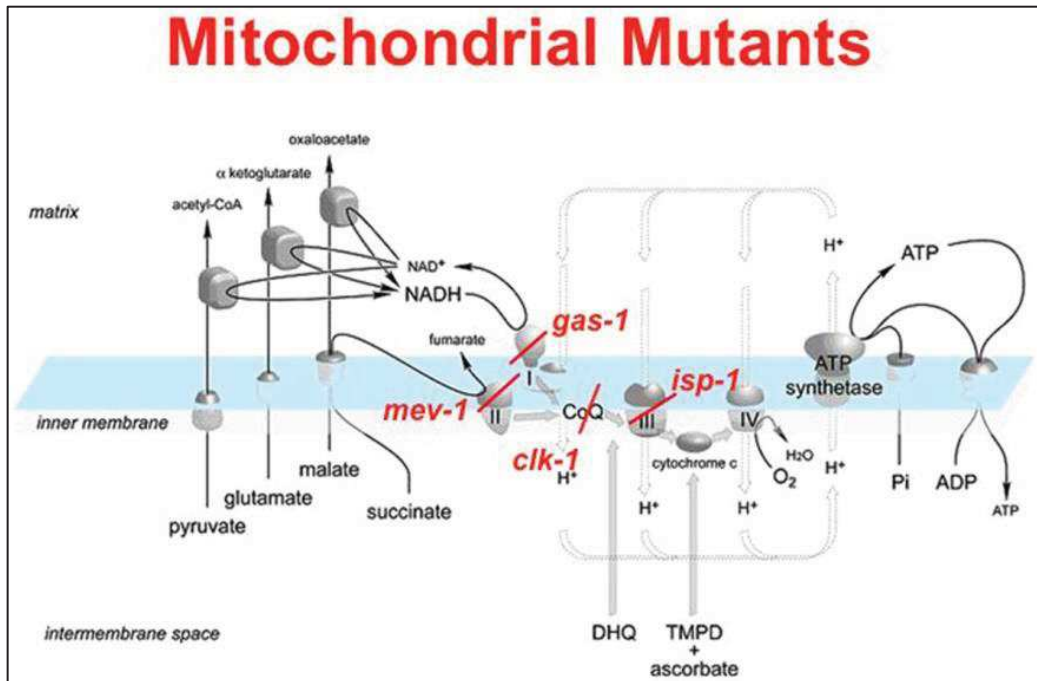
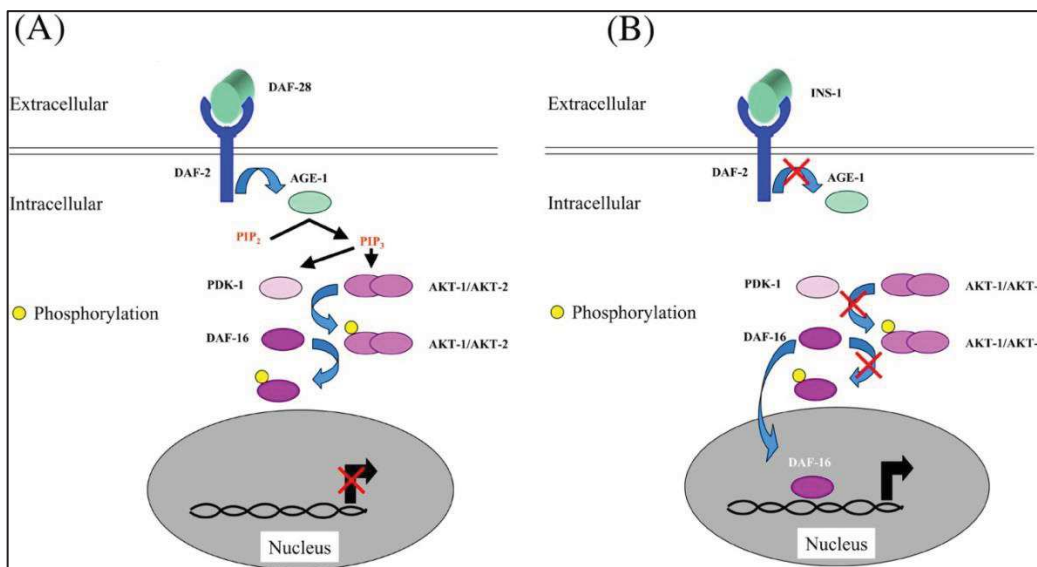


Figure 5 : Schéma de la voie DAF-2 / DAF-16 d'après Ewbank, 2006 extrait du *WormBook*.



## 5. Culture de *Caenorhabditis elegans*

Toutes les souches utilisées lors de mes études ont été fournies par le CGC. Les conditions de culture sont identiques quelles que soient les souches avec seulement des températures et des temps de croissance pouvant être variables.

### 5.1 – Conditions de culture

L'ensemble des individus utilisés pour mes études ont été maintenus sur boîtes de pétri dans un milieu NGM-Agar (Nematode Growth Medium) (Brenner, 1974). L'utilisation de ce milieu gélosé plutôt que des cultures en milieu liquide a été employée afin de faciliter l'observation et la manipulation rapide des nématodes. La composition du milieu NGM-Agar est présentée tableau 2.

Le coulage du milieu NGM-Agar sur boîte de pétri est réalisé de façon stérile sous la flamme. Après solidification du milieu, des *Escherichia coli* (souche HT115(DE3)) sont déposées sur les boîtes. Ces bactéries constituent la source de nourriture des *C. elegans*.

Tableau 2 : Composition du milieu NGM-Agar pour 1 litre

Composé	Quantité (poids ou volume)
Eau osmosée	975 ml
NaCl	3 g
Agar	20 g
Peptone	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> 1M	1 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M pH6	25 ml
Cholestérol (5mg/ml dans Ethanol)	1 ml

### 5.2 – Synchronisation et transfert des individus

Différentes techniques ont été utilisées afin de transférer et synchroniser sur boîtes les nématodes (Stiernagle, 2006). En fonction des expériences réalisées, deux méthodes ont été utilisées : le repiquage sur boîte et la synchronisation des individus ou bleach.

### **5.2.1 – Repiquage**

Le repiquage et le transfert des individus d'une boîte à une autre est réalisé à l'aide d'un fil de platine diamètre 0.25mm monté sur une pipette pasteur. La stérilisation à la flamme du fil est nécessaire avant chaque repiquage pour éviter toute contamination (extérieure ou d'une souche à une autre). Cette technique permet de transférer les nématodes de façon individuelle. On peut ainsi observer un individu en particulier (phénotype, morphologie,...) et étudier sa descendance. Cependant, elle nécessite de la pratique et n'est pas utilisable pour les expériences nécessitant un grand nombre d'individus.

### **5.2.2 – Synchronisation ou bleach**

Cette méthode utilise une solution alcaline d'hypochlorite de sodium à 10%. Elle permet de récupérer les œufs d'une population de nématodes en éliminant les larves et les adultes. Elle est couramment employée pour synchroniser une population ou éliminer une contamination (Hart, 2006 ; Porta-de-la-Riva et al., 2012 ; Shaham, 2006). Le protocole est présenté en Annexe A. Il a été adapté à partir du wormbook (Stiernagle, 2006). Cette technique permet d'obtenir un nombre d'individus synchronisés au stade œuf très important et une culture parfaitement propre (décontamination).

## ***II - ETUDE SUR LES GAZ***



# **Etude de la toxicité, mutagénicité et cancérogénicité de gaz à utilisation industrielle chez *Caenorhabditis elegans***

**Myriam RICHAUD, Pierre CUQ et Simon GALAS**

Laboratoire de toxicologie  
IBMM UMR 5247 – Equipe F16  
Université de Montpellier – Faculté de Pharmacie

**Audrey SCHLERNITZAUER, Gérard CROS et Richard MAGOUS**

Laboratoire de pharmacologie  
IBMM UMR 5247 – Equipe F13  
Université de Montpellier – Faculté de Pharmacie

**Abdelkader DAHMANI, Franck GUILLEM et Hubert BLANCOU**

S3F Chimie  
Université de Montpellier – Faculté de Pharmacie

## 1. Introduction

Depuis les années 60, le gaz SF<sub>6</sub> (Hexafluorure de soufre) est utilisé comme gaz d'isolation dans les appareillages moyenne et haute tension (Koch, 2003). Ce gaz possède une bonne tenue diélectrique, de bonnes qualités techniques, une bonne stabilité chimique et un point d'ébullition bas. Cependant, il est également un gaz à effet de serre. Son coefficient GWP<sup>100</sup> (Global Warming Potential sur une durée de 100 ans) ou PRG (Potentiel de Réchauffement Global) est de 23500. Sa durée de vie dans l'atmosphère est longue (entre 800 et 3200 ans). Cela implique une réduction nette de son utilisation à court terme et un remplacement total à moyen terme.

Depuis les années 1970, le remplacement du gaz SF<sub>6</sub> a fait l'objet de nombreuses recherches. Jusqu'à maintenant, il n'a pas été possible de le remplacer par un gaz à la fois non toxique, présentant de bonnes propriétés diélectriques et avec un bon PRG.

Le but de cette étude est de tester, d'un point de vue toxicité aiguë, mutagénicité et cancérogénicité sur le modèle *Caenorhabditis elegans*, de nouveaux gaz candidats. L'ensemble des données recueillies a permis de dresser un « package » cohérent de données quantitatives concernant l'impact physiologique et moléculaire de ces gaz.

### 1.1 – Propriétés et utilisation du gaz SF<sub>6</sub> dans l'industrie électrique

#### 1.1.1 – Propriétés du gaz SF<sub>6</sub>

Le seul procédé industriel actuellement utilisé pour la fabrication du gaz SF<sub>6</sub> est sa synthèse à partir de soufre et de fluor obtenu par électrolyse, selon la réaction exothermique suivante :  $S + 3F_2 \rightarrow SF_6 + 262 \text{ kcal}$  (Koch, 2003).

Le gaz SF<sub>6</sub> (figure 6) est un gaz incolore, inodore, non toxique, ininflammable, insoluble dans l'eau, non explosif et thermiquement stable. Il est chimiquement inerte et a une enthalpie élevée. Il possède une très bonne tenue diélectrique (trois fois supérieure à l'air) (Koch, 2003 ; Théoleyre, 1999).

Son point d'ébullition est raisonnablement bas (environ -64°C) (Marshall, 1976).

Ce gaz peut être utilisé comme moyen d'isolation mais également comme un très bon moyen de coupure de l'arc électrique. Il a une bonne capacité de transfert thermique et est capable de se reformer à partir des produits de décomposition formés par des décharges électriques à haute pression (Koch, 2003 ; Théoleyre, 1999). Le gaz SF<sub>6</sub> est également un bon isolant phonique (Koch, 2003).

Le SF<sub>6</sub> est chimiquement compatible avec la plupart des matériaux solides utilisés dans les appareillages électriques.

Il ne présente aucun effet écotoxique, mutagène ou carcinogène (génomotoxique ou épigénétique) sur la santé. Cette absence de toxicité à l'état pur a été mise en évidence par des tests réalisés sur l'animal. Des souris ont été placées pendant 24 heures dans une atmosphère contenant 80% de SF<sub>6</sub> et 20% d'oxygène. Ce test biologique est celui recommandé par la norme CEI 60376 : *Spécifications de la*

qualité technique de l'hexafluorure de soufre (SF<sub>6</sub>) pour utilisation dans les appareils électriques (Koch, 2003).

Pour toutes ces raisons, le SF<sub>6</sub> est largement utilisé dans l'industrie électrique (disjoncteurs, postes blindés, câbles isolés, condensateurs,...) (Christophorou et al., 1997).

Figure 6 : Formule chimique du gaz SF<sub>6</sub>



SF<sub>6</sub>

Hexafluorure de soufre

Numéro CAS : 2551-62-4

UN1080

### **1.1.2 – Produits de décomposition par l'arc électrique**

L'arc électrique peut atteindre des températures très élevées, de l'ordre de 15000K soit 14726°C. À ces températures, une petite proportion du gaz SF<sub>6</sub> est décomposée.

Les produits de décomposition solides ou gazeux contiennent, en dehors du soufre et du fluor, des éléments comme le carbone, le silicium, l'oxygène, l'hydrogène, le tungstène ou encore le cuivre.

Les principaux sous-produits gazeux, identifiés par les laboratoires qui ont travaillé sur ce sujet en associant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, sont :

- l'acide fluorhydrique,
- le dioxyde de carbone,
- l'anhydride sulfureux,
- le tétrafluorure de carbone,
- le tétrafluorure de silicium,
- le fluorure de thionyle,
- le fluorure de sulfuryle,
- le tétrafluorure de soufre,
- le décafluorure de soufre.

Certains de ces sous-produits peuvent être toxiques, mais sont aisément adsorbés sur des matériaux absorbants comme l'alumine activée ou les tamis moléculaires.



Si l'adsorbant est présent dans l'appareil en quantité suffisante, le degré de corrosion dû aux produits de décomposition du SF6 est très faible voire négligeable (Koch, 2003).

### **1.1.3 – Autres utilisations du gaz SF6**

Le gaz SF6 est également utilisé dans de nombreux autres domaines scientifiques et industriels (Koch, 2003) tels que :

- applications médicales : instrumentation chirurgicale, appareils médicaux,...
- isolation électrique d'appareils scientifiques comme les microscopes électroniques,
- isolation phonique des fenêtres double vitrage,
- gaz traceurs,
- ...

### **1.2 – Effet de serre**

Cependant, un problème environnemental grave est lié à l'utilisation du gaz SF6. En effet, le rejet de ce gaz conduit à un effet de serre très important.

D'après l'Agence Internationale de l'Energie, en 2012, les gaz fluorés représentaient à eux seuls 2% de l'ensemble des gaz à effet de serre (figure 7). L'évaluation de 2010 du Groupe d'Evaluation Scientifique PNUE a révélé que le gaz SF6 représentait 3% des gaz fluorés (figure 8).

Son PRG est de 23500. Ce coefficient signifie qu'un kilogramme de gaz SF6 a le même impact sur le réchauffement climatique que 23500 kilogrammes de CO<sub>2</sub>. D'autre part, sa durée de vie dans l'atmosphère est très longue (entre 800 et 3200 ans) (Christophorou et al., 1997).

Lors du protocole de Kyoto en 1997, ce gaz a donc été listé comme un gaz à effet de serre dont l'émission doit être réduite.

Figure 7 : Répartition globale des gaz à effet de serre d'après l'Agence Internationale de l'Energie (2012)

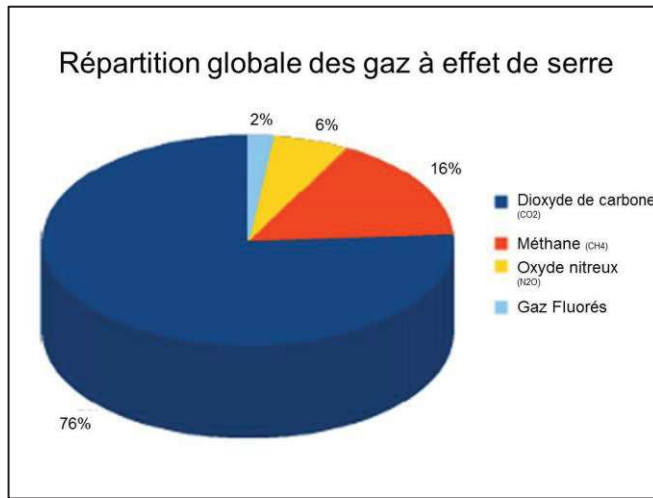
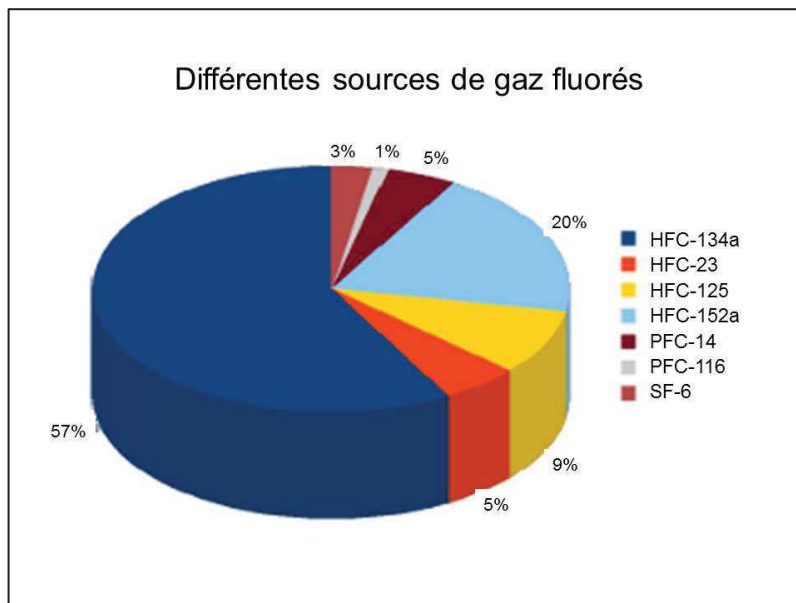


Figure 8 : Répartition des différentes sources de gaz fluorés d'après l'évaluation de 2010 du Groupe d'Evaluation Scientifique, PNUE



### 1.3 – Réduction et remplacement du SF6

La contribution du SF6 au réchauffement climatique implique la réduction de son utilisation à court terme et son remplacement à moyen terme.

Des procédures internationales ont été mises en place concernant la récupération et le recyclage du SF<sub>6</sub>, notamment le bulletin technique CEI 61634 : *Appareillage à haute tension – Utilisation et manipulation de gaz hexafluorure de soufre (SF<sub>6</sub>) dans l'appareillage à haute tension*. Plus récemment, en avril 2014, l'union européenne a adopté un règlement visant à réduire de deux tiers les émissions de gaz à effet de serre fluorés d'ici 2030. Ce règlement prévoit des interdictions de mise sur le marché, un système de quotas et un meilleur encadrement du cycle de vie de ces gaz. Son entrée en vigueur a été effectuée au 1<sup>er</sup> janvier 2015.

La recherche de gaz de remplacement a donc activement été lancée.

Ce gaz doit posséder une rigidité diélectrique élevée ainsi que d'autres caractéristiques telles qu'une température de liquéfaction inférieure à -50°C, une bonne stabilité chimique, une toxicité et un impact sur l'environnement faible,...

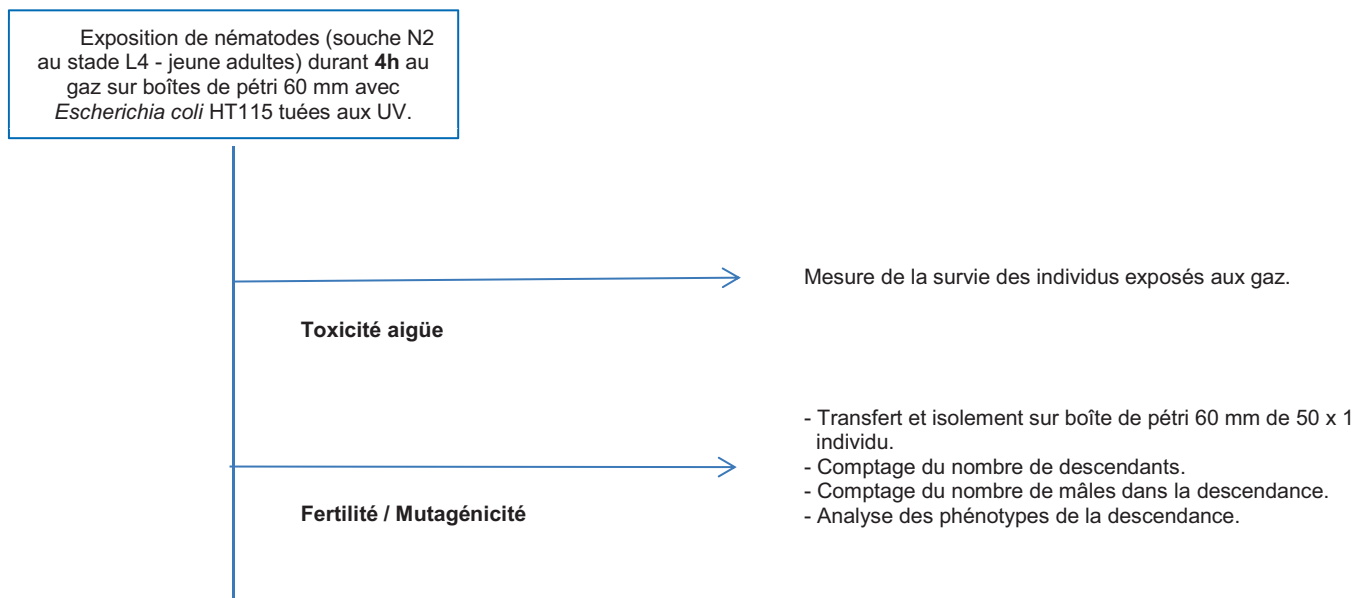
Lors d'un communiqué de presse à Paris en Août 2014, la société 3M annonçait son intention de fournir à l'industrie des appareillages électriques moyenne et haute tension des solutions durables d'isolation en remplacement du gaz SF<sub>6</sub>.

Un tel gaz n'a toujours pas été trouvé. C'est pourquoi le gaz SF<sub>6</sub> est toujours actuellement utilisé et un gaz de remplacement toujours recherché.

Le gaz SF<sub>6</sub>, compte tenu de ses bonnes propriétés diélectriques et de son absence de toxicité, est donc largement utilisé dans l'industrie électrique. Cependant, le rejet de ce gaz conduisant à un effet de serre très important, il doit être remplacé à moyen terme. Pour cela, différents gaz ont donc été développés. Le but de cette étude est de tester, *in vivo*, à l'aide du modèle *C. elegans*, ces différents gaz d'un point de vue toxicité aiguë, mutagénicité et cancérogénicité.

## 2. Matériels et méthodes

Le protocole expérimental mis en œuvre pour chacune de nos expériences est le suivant:



Les nématodes sont nourris avec des bactéries *Escherichia coli* HT115(DE3) préalablement tuées aux ultraviolets afin d'éviter tout artéfact dans les expériences. En effet, les bactéries vivantes, en contact avec des molécules, composés ou gaz, peuvent fabriquer des métabolites secondaires ayant un impact positif ou négatif en termes de toxicité, mutagénicité et cancérogénicité (Cabreiro et al., 2013). Le fait de tuer au préalable les bactéries permet de s'affranchir de ce paramètre.

### 2.1 – Mesures de la toxicité aigüe

Cette expérience vise à donner une première indication des effets des gaz en conditions normales et standardisées.

Des individus au stade L4 jeunes adultes sont exposés aux gaz puis sont observés sous loupe binoculaire durant 7 jours afin de déterminer leur taux de survie et leurs malformations éventuelles. Ces données permettent ainsi une évaluation de la toxicité des gaz.

## 2.2 – Fertilité / Mutagénicité

Les mécanismes de la reproduction peuvent être la cible de facteurs environnementaux ou de molécules exogènes aux effets mutagènes. Ces perturbations aux effets positifs ou négatifs peuvent être le résultat d'une action sur la division des cellules germinales primaires, de perturbations de la méiose ou encore de la fécondation.

Des individus adultes sont disposés dans des boîtes NGM-Agar de 60 mm contenant des *E. coli* et exposés au gaz durant 4h. Cinquante individus sont ensuite isolés de façon individuelle sur boîtes NGM-Agar 60 mm. Une numération de leur descendance est réalisée et l'observation de sa viabilité évaluée.

Ces données permettent de savoir si la fertilité s'écarte des valeurs attendues à 20°C. Cela est un indicateur de perturbations des divisions cellulaires germinales.

Une observation d'effets mutagènes potentiels est réalisée par comptage des individus mâles dans la population issue des individus exposés au gaz. En effet, la fréquence normale des mâles dans la population est de 0,1% à 0,2% (Hodgkin et Doniach, 1997 ; Ward et Carrel, 1979). Toute augmentation est un indicateur de perturbations chromosomiques.

D'autre part, les phénotypes anormaux observés sur la descendance sont également analysés comme reflet d'un effet mutagène. En effet, des mutations apparaissent spontanément chez *C. elegans*. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de duplications de gènes ou au contraire de délétions. Leur fréquence est respectivement de  $2 \cdot 10^{-8}$ ,  $3,4 \cdot 10^{-7}$  et  $2,2 \cdot 10^{-7}$  par gène et par génération (Denver et al., 2004 ; Lipinski et al., 2011). Elles peuvent être dues à des défaillances dans le système de réplication et de réparation du génome, à des dommages oxydatifs ou à des facteurs environnementaux. Un écart par rapport à ces valeurs de référence reflète un effet mutagène.

*C. elegans* étant un organisme entier, les phénotypes anormaux pouvant être observés sont nombreux. Les plus flagrants et les principaux sont :

- unc pour uncoordinated : ces nématodes ne sont pas coordonnés dans leurs déplacements. Ils font par exemple des mouvements d'avant en arrière et semblent « bloqués ».
- clear : comme son nom l'indique, ce phénotype donne des individus beaucoup plus clairs que la normale.
- roller : ces vers tournent sur eux-mêmes.
- bagging : ces individus ont une vulve qui grossit par accumulation d'œufs. Ce phénotype aboutit la plupart du temps à une éclosion des œufs à l'intérieur de l'hermaphrodite et un éclatement de la vulve.
- malformations diverses telles que des individus raccourcis, des problèmes de malformations de la vulve,...

Pour chacune des manipulations réalisées, la même expérience est menée en parallèle avec des individus non exposés au gaz afin d'avoir des valeurs témoins.

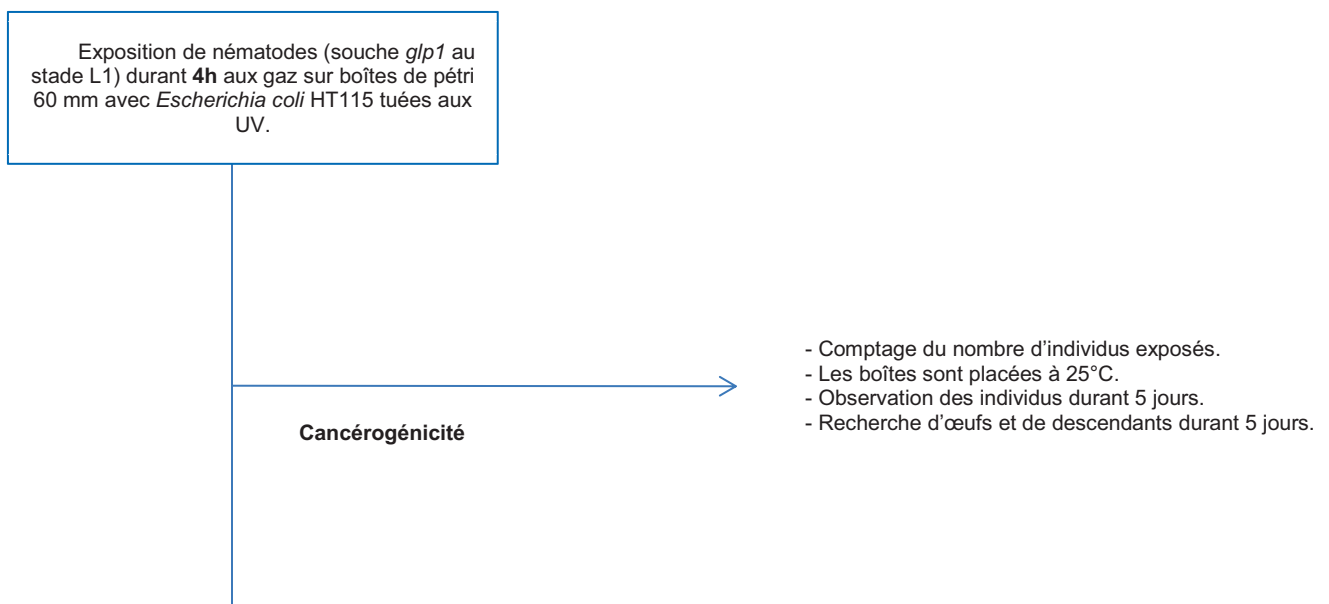
La souche *daf-16* a été utilisée ponctuellement afin de comparer les résultats obtenus sur la souche N2. Rappelons que le gène DAF-16 régule la formation des dauer, la longévité, le métabolisme des graisses, la réponse au stress et le système immunitaire. Cette souche de *C. elegans daf-16* est donc plus sensible à certains facteurs environnementaux, toxiques,...

### 2.3 – Cancérogénicité

Des expériences ont été menées afin de déterminer si ces gaz doivent être considérés comme cancérogènes. Pour se faire, la souche *glp-1* a été utilisée.

Après exposition aux gaz, en sortie de réacteur, les individus sont observés sous loupe binoculaire et comptés. Ils sont ensuite placés à 25°C et observés deux fois par jours sur 5 jours afin de vérifier la présence d'œufs et de descendants sur les boîtes.

Les mutants *glp-1* étant normalement stériles à cette température (mutation touchant la lignée germinale), la présence d'œufs ou de descendants sur les boîtes serait ainsi révélatrice d'un effet cancérogène.



### 2.4 – Gaz et mélanges de gaz étudiés

Trois gaz alternatifs au SF6 ont été mis au point par un fournisseur de gaz et ont été testés par nos soins d'un point de vue toxicité, mutagénicité et cancérogénicité sur le modèle *C. elegans*. Ces gaz que nous noterons X, Y et Z sont tous les trois des gaz fluorés. Des expériences similaires sur des gaz connus (Hexafluoropropène et Hexafluorure de soufre) ont également été réalisées pour comparaisons. Toutes nos expériences ont été réalisées en parallèle sur le modèle souris par l'équipe d'Audrey SCHLERNITZAUER, Gérard CROS et Richard MAGOUS (équipe rongeurs). Leurs études sur rongeur nous ont permis d'avoir des valeurs de référence pour les CL<sub>50/4H</sub>. La préparation des gaz et les dosages ont été réalisés par les chimistes de S3F Chimie.

### **2.4.1 – Gaz X**

- *Gaz X air sec échauffement / fermeture – 100 000 ppmv*

Ce gaz est le premier gaz fluoré testé pour notre étude. Il correspond au gaz X ayant subi des échauffements fermetures. En cas de problème de fuite ou d'explosion, c'est à ce gaz que les individus seront potentiellement exposés.

La concentration de 100000 ppmv correspond à la CL<sub>50/4H</sub> déterminée à partir du modèle souris femelles par l'équipe rongeurs.

- *Gaz X air sec échauffement / fermeture – 160 000 ppmv*

Il s'agit du même gaz que précédemment mais cette fois à une concentration de 160000 ppmv. En effet, la CL<sub>50/4H</sub> de 100000 ppmv est observée chez les souris femelles mais les mâles ont une CL<sub>50/4H</sub> un peu supérieure (120000 ppmv). Cette concentration est donc très supérieure à la CL<sub>50/4H</sub> déterminée chez les souris mâles et femelles.

- *Gaz X pur – 20 000 ppmv*

Nous travaillons ici avec le gaz primaire tel qu'il est fourni par la société qui le commercialise. Cette concentration correspond à la concentration de X pur contenue dans le gaz X air sec échauffement / fermeture à 100000 ppmv.

- *Gaz X pur - 32 000 ppmv*

Cette concentration correspond à la dose de X pur contenue dans le gaz X air sec échauffement / fermeture à 160000 ppmv.

- *Gaz X pur – 26 000 ppmv*

26000 ppmv correspondent à une dose intermédiaire de gaz X qui nous sera utile afin de tester l'effet dose du gaz.

### **2.4.2 – Gaz Y**

- *Gaz Y échauffement / fermeture – 220 000 ppmv*

Le gaz Y est le second gaz candidat pour remplacer le gaz SF6. Sa toxicité et sa mutagénicité doivent donc également être évaluées. Cependant, ses propriétés diélectriques n'étant pas très bonnes, son utilisation industrielle sera limitée. La dose de 220000 ppmv correspond à la CL<sub>50/4H</sub> déterminée sur le modèle souris mâles et femelles.

### **2.4.3 – Gaz Z**

- *Gaz Z pur Respal – 15 000 ppmv*

Ce gaz Z est le troisième gaz fluoré testé pour notre étude. Il correspond au gaz Z pur dans de l'air respirable. La concentration de 15000 ppmv est la concentration retrouvée dans la fiche sécurité du fournisseur de gaz (CL<sub>50</sub> < 15000 ppm).

- *Gaz Z pur Respal – 5 000 ppmv*

Il s'agit du même gaz que précédemment mais cette fois à une concentration beaucoup plus faible de 5000 ppmv.

- *Gaz Z pur Respal – 30 000 ppmv*

Il s'agit à nouveau du même gaz mais cette fois à une concentration beaucoup plus importante de 30 000 ppmv. Cette gamme de concentration nous permettra de tester l'effet dose du gaz Z.

- *Gaz Z après coupure – 2 000 ppmv*

Le gaz Z après coupure est le produit de décomposition du gaz Z Respal après coupure électrique. Celui-ci se décompose en donnant de nombreux sous-produits chimiques. Ces derniers, pris un par un, présentent une toxicité avec une  $CL_{50}$  plus ou moins importante selon la molécule. Cette valeur de 2000 ppmv a été choisie en réalisant un calcul théorique tenant compte de la concentration de chaque composé et de sa  $CL_{50}$ . Cet essai a permis de déterminer si une coupure électrique appliquée sur ce gaz le rend plus dangereux que le gaz pur.

#### **2.4.4 – Autres gaz**

- *Gaz HFP – 150 ppmv*

HFP : Hexafluoropropène ; CAS : 116-15-4

Le gaz HFP est l'un des sous-produits du gaz X après échauffement fermeture. Cette concentration de 150 ppmv correspond à la dose de HFP contenue dans le gaz X air sec échauffement / fermeture à 160000 ppmv. Elle correspond également à environ  $1/10^{\text{ème}}$  de la  $CL_{50/4H}$  du gaz HFP obtenue sur le modèle souris.

- *Gaz SF6 – 100 000 ppmv*

SF6 : Hexafluorure de soufre ; CAS : 2551-62-4

Le gaz SF6 est ici utilisé comme témoin négatif car il a été décrit, comme vu précédemment, comme non mutagène ni cancérigène. La concentration de 100000 ppmv correspond à sa  $CL_{50/4H}$  obtenue chez la souris.

#### **2.5 – Dosage des composés fluorés par RMN 19F**

Lors de l'expérience réalisée sur le gaz X air sec échauffement / fermeture à 100000 ppmv, des boîtes NGM-Agar de 92 mm contenant des nématodes à confluence (plusieurs milliers) sont placées dans le réacteur (6 boîtes exposées et 6 boîtes témoins). Les *E. coli* qui servent de nourriture aux vers ont été préalablement tuées aux UV afin de ne pas fausser la manipulation. En sortie de réacteur, les individus issus des 6 boîtes exposées d'une part et des 6 boîtes témoins d'autre part, sont récupérés dans du milieu M9. Trois lavages dans ce milieu sont réalisés afin de supprimer toute trace de bactéries. Les culots ainsi formés sont placés dans deux tubes eppendorf, l'un contenant du chloroforme deutéré ( $CDCl_3$ ) et l'autre du diméthylesulfoxyde deutéré (DMSO  $d_6$ ). Une série de 10 Vortex en continu durant 30 secondes est effectuée afin de casser les membranes des vers. Chacun des tubes est ensuite analysé par RMN 19F pour un dosage des composés fluorés. Cette



expérience a pour but, d'une part de déterminer si le dosage et la quantification des composés fluorés sont possibles sur un culot de nématodes et, d'autre part de vérifier quels composés sont retrouvés dans les vers après exposition. Nous pourrons ainsi comparer nos résultats avec ceux obtenus sur le modèle souris.

### **3. Résultats**

#### **3.1 – Etude sur le gaz X**

L'ensemble des résultats obtenus sur le gaz X est présenté dans le tableau 3 et la figure 9.

##### **3.1.1 – Exposition au gaz après échauffement fermeture à 100 000 ppmv**

###### a) Toxicité aigüe (N=50 individus)

La toxicité du gaz à J7 est de 28%. Des problèmes de comportement des individus exposés ont été détectés. En effet, 64% des individus morts ont été retrouvés desséchés en bord de boîte. Cela montre un phénomène de fuite. Ce gaz, à cette dose, a également engendré des problèmes de ponte. 16% des individus ont eu un nombre de descendants inférieur à 10. De plus, 10% des individus exposés sont restés bloqués au stade L4 jeunes adultes durant 5 jours avant de repartir dans un cycle normal.

###### b) Mutagenicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=1855)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés et témoins est similaire :  $63,98 \pm 39,05$  contre  $81,30 \pm 38,85$ . Le nombre de mâles dans la descendance est nul. Aucun phénotype particulier n'a été observé sur la génération F1.

##### **3.1.2 – Exposition au gaz après échauffement fermeture à 160 000 ppmv**

###### a) Toxicité aigüe (N=50 individus)

Sur les 50 individus exposés, aucune toxicité n'a été observée à J7.

###### b) Mutagenicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=5341)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés et témoins est similaire :  $106,83 \pm 22,82$  contre  $104,50 \pm 19,72$ . Dans la descendance, le taux de mâles comptabilisé est de 0,3%. Comme vu précédemment, ce taux est supérieur à la normale. De plus, de nombreux phénotypes anormaux ont été observés : Unc, Roller, Clear ainsi que des malformations (éclatement, individus raccourcis, problème de vulve). Ces problèmes touchent 72% des boîtes et 2% de la descendance totale.

c) Cancérogénicité (N=1500 individus)

Sur les 1500 individus de la souche *glp-1* exposés, aucun mort n'a été observé. Ce gaz, à cette concentration, ne présente donc pas de toxicité aiguë, corroborant les résultats obtenus sur la souche sauvage.

Aucune descendance n'a été observée à 25°C. Cependant, un nombre important de malformations de la vulve ont été révélées. Ce phénomène touche environ 1% des individus.

**3.1.3 – Exposition au gaz pur à 20 000 ppmv**

a) Toxicité aiguë (N=50 individus)

En sortie de réacteur, les nématodes avec ce gaz semblaient anesthésiés, très peu mobiles, mais cela n'a eu aucun impact sur leur longévité. Leur mobilité était normale à 24 heures. Le taux de mortalité observé à J7 est de 2%.

b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=6370)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés et témoins est similaire :  $130,00 \pm 40,75$  contre  $161,27 \pm 35,35$ . Le taux de mâles dans la descendance est inférieur à 0,1%. Seuls 2 individus de la F1 présentent un phénotype anormal, ce qui est négligeable.

**3.1.4 – Exposition au gaz pur à 32 000 ppmv**

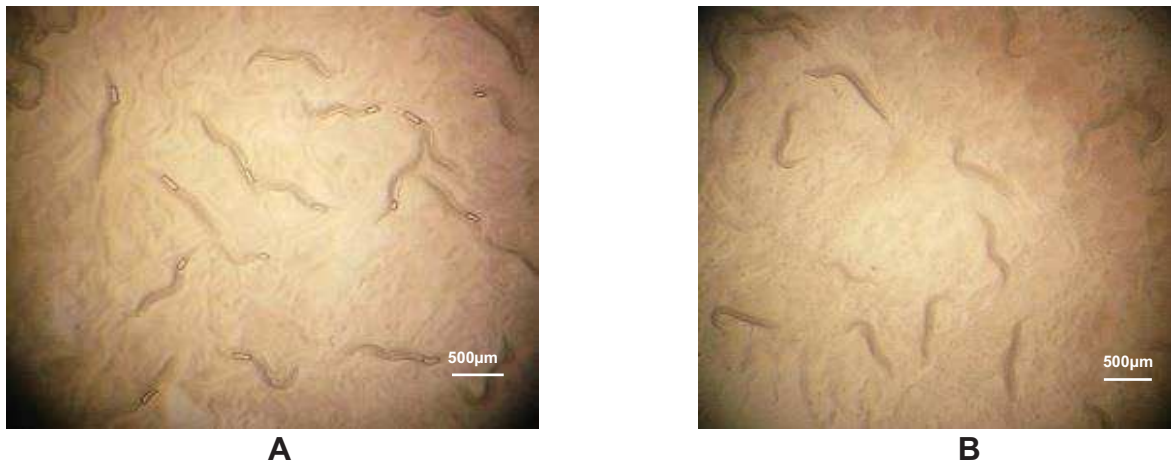
a) Toxicité aiguë (N=50 individus)

Au terme des 4 heures d'exposition au gaz à cette dose, des « bulles » ont été observées sur les vers exposés. Ce phénomène a touché environ 95% des individus. Une bulle à l'arrière de leur tête semble remplir toute la largeur des nématodes (figure 10). La toxicité du gaz à J7 est de 58%.

b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=3126)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est bien inférieur aux individus témoins :  $62,53 \pm 41,24$  contre  $181,08 \pm 32,19$ . Le gaz X à cette dose a clairement un effet sur la reproduction. Le taux de mâles dans la descendance est de 0,22% donc supérieur à la normale. De plus, de nombreux phénotypes anormaux ont été identifiés : Unc, Clear ainsi que des malformations. Ainsi, 64% des boîtes sont touchées.

Figure 9 : Photos des nématodes exposés au gaz pur à 32000 ppmv (A) et des témoins (B), en sortie de réacteur, au terme des quatre heures d'exposition.



### **3.1.5 – Exposition au gaz pur à 26 000 ppmv**

#### **a) Toxicité aigüe (N=50 individus)**

A cette concentration intermédiaire, des « bulles » sont également observées à l'intérieur des vers. Moins d'individus sont touchés qu'à 32000 ppmv mais cela touche ici 20% des individus exposés (figure 11). La toxicité de ce gaz à J7 est de 14%.

#### **b) Mutagenicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=7500)**

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés et témoins est similaire :  $153,06 \pm 48,25$  contre  $143,74 \pm 42,41$ . Le taux de mâles dans la descendance est inférieur à 0,1%. De nombreux phénotypes anormaux sont observés : Unc, Clear ainsi que des malformations. Ainsi, 52% des boîtes sont touchées.

Figure 10 : Photos des nématodes exposés au gaz pur à 26000 ppmv (A) et des témoins (B), en sortie de réacteur, au terme des quatre heures d'exposition.

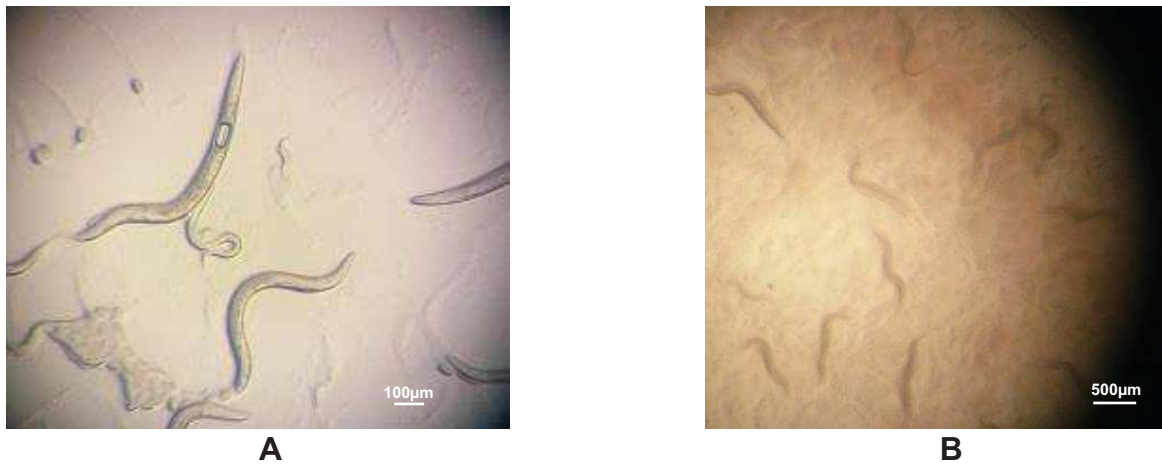


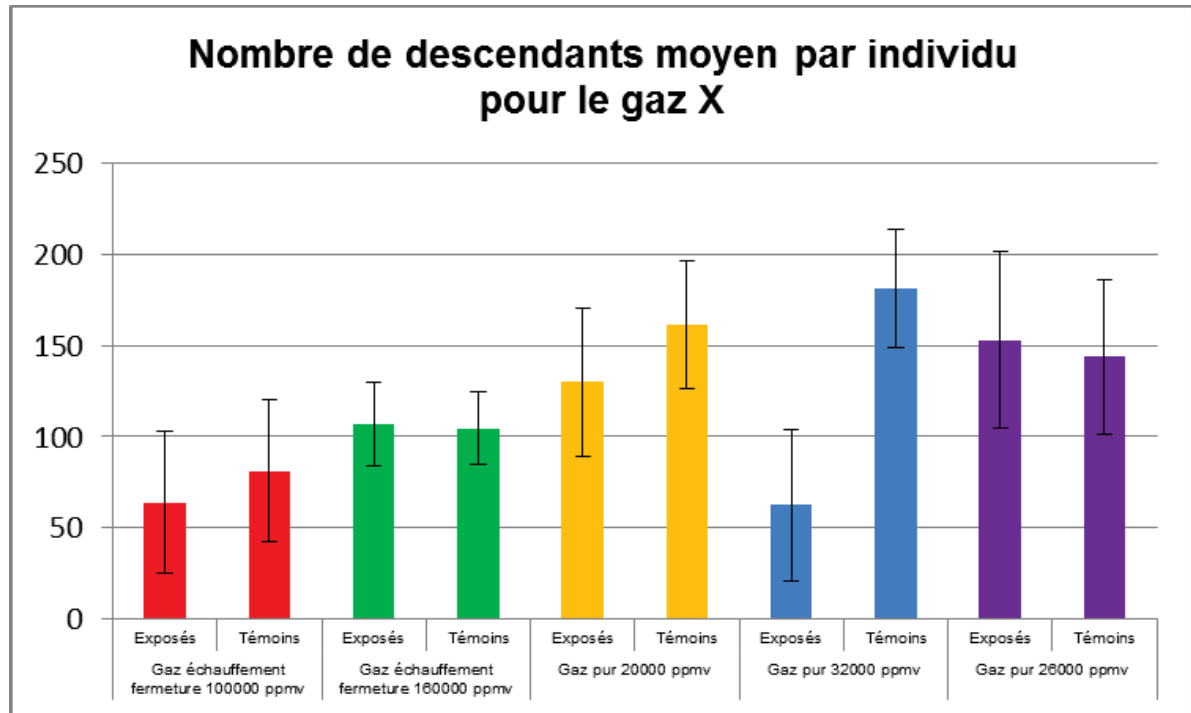
Tableau 3 : Toxicité, mutagénicité et cancérogénicité du gaz X

- Les tests de toxicité ont été réalisés sur 50 individus N2.
- Les expériences de mutagénicité ont été réalisées par analyse de la descendance de 50 individus N2 exposés au gaz X.
- Les tests de cancérogénicité ont été réalisés sur un effectif de 1500 individus *glp-1* exposés au gaz X.
- Chacune des expositions au gaz a été réalisée une fois.
- Pour chaque exposition, la même expérience a été réalisée en parallèle sur un même effectif d'individus témoins non exposés au gaz (contrôle négatif).

		Echauffement Fermeture 100 000 ppmv	Echauffement Fermeture 160 000 ppmv	Pur 20 000 ppmv	Pur 32 000 ppmv	Pur 26 000 ppmv
Toxicité aigüe		28%	0%	2%	58% et effet "bulle" de 95%	14% et effet "bulle" de 20%
Mutagénicité	Taux de mâles	0%	0,3%	<0,1%	0,22%	<0,1%
	Phénotypes particuliers	Absence	72% boîtes avec des individus Unc, Roller, Clear ou des malformations	Négligeable	64% des boîtes avec des individus Unc, Clear ou des malformations	52% des boîtes avec des individus Unc, Clear ou des malformations
Cancérogénicité			Pas de descendance mais 1% des individus avec des malformations de la vulve			

Figure 11 : Nombre moyen de descendants par individu lors des différentes expositions au gaz X

- Pour chaque exposition au gaz X, la descendance de 50 individus N2 a été comptée. Est représentée ici la moyenne du nombre de descendants obtenus.
- Pour chaque expérience, le même comptage a été réalisé sur 50 individus N2 contrôles non exposés.



### 3.2 – Etude sur le gaz Y

Cette étude sur le gaz Y a été réalisée à une concentration de 220000 ppmv. L'ensemble des résultats obtenus sur le gaz Y est présenté dans le tableau 4 et la figure 12.

#### a) Toxicité aiguë (N=50 individus)

Sur l'ensemble des individus exposés, aucune toxicité n'a été observée.

#### b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=7458)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés et témoins est similaire :  $149,17 \pm 29,31$  contre  $134,52 \pm 31,38$ . Le taux de mâles dans la descendance est inférieur à 0,1%. Le nombre de phénotypes anormaux (malformations, paralysies, Unc, Roller) représente 0,1% de l'ensemble des individus de la génération F1.

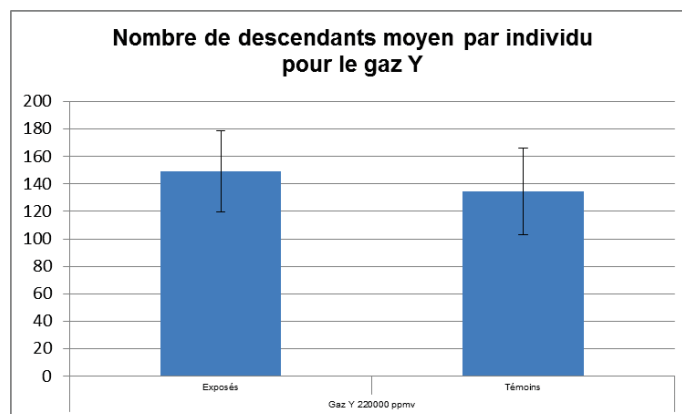
Tableau 4 : Toxicité et mutagénicité du gaz Y

- Le test de toxicité a été réalisé sur 50 individus N2.
- L'expérience de mutagénicité a été réalisée par analyse de la descendance de 50 individus N2 exposés au gaz Y.
- Ces résultats ont été obtenus lors d'une exposition.
- La même expérience a été réalisée en parallèle sur un même effectif d'individus témoins non exposés au gaz (contrôle négatif).

		Gaz Y 220 000 ppmv
Toxicité aigüe		0%
Mutagénicité	Taux de mâles	<0,1%
	Phénotypes particuliers	18% boîtes avec des individus Unc, Roller ou des malformations (0,1% des individus)
Cancérogénicité		

Figure 12 : Nombre moyen de descendants par individu lors de l'exposition au gaz Y

- Suite à l'exposition au gaz Y, la descendance de 50 individus N2 a été comptée. Est représentée ici la moyenne du nombre de descendants obtenus.
- Le même comptage a été réalisé sur 50 individus N2 contrôles non exposés.



### 3.3 – Etude sur le gaz Z

L'ensemble des résultats obtenus sur le gaz Z sont présentés dans le tableau 5 et la figure 13.

### 3.3.1 – Exposition au gaz pur à 15 000 ppmv

#### a) Toxicité aigüe (N=100 individus)

La toxicité du gaz Z à cette dose est croissante au fil des jours avec une toxicité de 30% à J7.

#### b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=10316)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est supérieur aux individus témoins :  $206,32 \pm 38,82$  contre  $150,40 \pm 26,14$ . Cependant, cette différence n'est pas significative compte tenu des écart-types. La fréquence des mâles est inférieure à 0,1%. De nombreux problèmes de comportement ont été observés sur la descendance avec 50% des boîtes présentant un problème de fuite des individus. Les nématodes creusent dans la gélose et partent en bord de boîte. 58% des boîtes présentent des individus morts ou malformés. Cela représente 5 individus pour 1000. Les malformations observées sont principalement des individus raccourcis, des problèmes au niveau de la vulve et des individus qui éclatent.

#### c) Cancérogénicité (N=1000 individus)

L'observation durant 5 jours des nématodes de la souche sauvage *glp-1* n'a permis de détecter aucun descendant à 25°C.

#### d) Toxicité aigüe et mutagénicité sur la souche *daf-16*

##### *Toxicité aigüe (N=100 individus)*

La toxicité du gaz Z à cette dose sur la souche *daf-16* est de 1% à J7. Cependant, des problèmes de malformations de la vulve sont apparus de façon tardive à partir de J7 (2%). Ce phénomène s'est amplifié avec une mortalité des individus malformés dès le lendemain. A J10, une mortalité de 5% et des malformations de l'ordre de 2% ont été observées.

##### *Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=7405)*

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est inférieur aux individus témoins :  $154,28 \pm 30,63$  contre  $198,04 \pm 36,83$ . Cependant, cette différence n'est pas significative compte-tenu des écart-types. La fréquence des mâles est inférieure à 0,1%. Des problèmes de fuite ont été observés sur la descendance avec 74% des boîtes présentant ce phénomène. 12% des boîtes présentent des individus morts ou malformés. Cela représente 0,8 individus pour 1000.



### **3.3.2 – Exposition au gaz pur à 5 000 ppmv**

a) Toxicité aigüe (N=100 individus)

La toxicité du gaz Z à cette dose est de 5% à J7. Ici aussi la toxicité est croissante au fil du temps.

b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=10664)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est identique aux individus témoins :  $213,29 \pm 45,29$  contre  $207,44 \pm 25,97$ . La fréquence des mâles est inférieure à 0,1%. Ici aussi ont été observés de nombreux problèmes de comportement avec des fuites et des malformations du même type que précédemment. 86% des boîtes présentent un problème de fuite des individus. 66% des boîtes présentent des individus morts ou malformés. Cela représente 6 individus pour 1000.

### **3.3.3 – Exposition au gaz pur à 30 000 ppmv**

a) Toxicité aigüe (N=100 individus)

La toxicité du gaz Z à cette dose est de 53% à J7.

b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=10150)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est identique aux individus témoins :  $203,01 \pm 42,05$  contre  $216,62 \pm 40,04$ . La fréquence des mâles est inférieure à 0,1%. Ont été observés de nombreux problèmes de comportement avec des fuites et des malformations identiques aux doses précédentes. 68% des boîtes présentent un problème de fuite des individus. 58% des boîtes présentent des individus morts ou malformés. Cela représente 6,2 individus pour 1000.

c) Cancérogénicité (N=1000 individus)

L'observation durant 5 jours des nématodes de la souche sauvage *glp-1* n'a permis de détecter aucun descendant à 25°C.

### 3.3.4 – Exposition au gaz après coupure à 2 000 ppmv

#### a) Toxicité aigüe (N=100 individus)

La toxicité du gaz Z après coupure à 2000 ppmv est de 7% à J7.

#### b) Mutagénicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=11982)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est identique aux individus témoins :  $239,64 \pm 41,47$  contre  $221,00 \pm 29,21$ . La fréquence des mâles est inférieure à 0,1%. Cette dose a révélé de nombreux problèmes de comportement avec des fuites et ici encore des malformations. 28% des boîtes présentent un problème de fuite des individus. 18% des boîtes présentent des individus morts ou malformés. Cela représente 1 individu pour 1000.

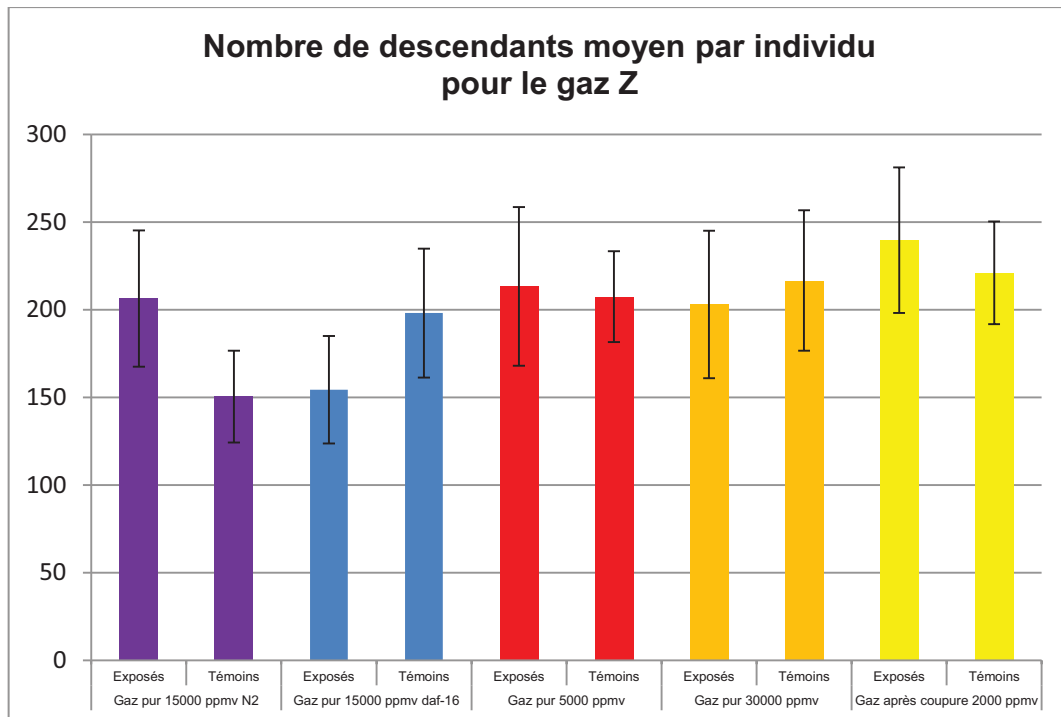
Tableau 5 : Toxicité, mutagénicité et cancérogénicité du gaz Z

- Les tests de toxicité ont été réalisés sur 100 individus N2.  
*Remarque* : Une exposition au gaz pur à 15000 ppmv a été réalisée sur la souche mutante *daf-16*.
- Les expériences de mutagénicité ont été réalisées par analyse de la descendance de 50 individus N2 exposés au gaz Z.  
*Remarque* : Une exposition au gaz pur à 15000 ppmv a été réalisée sur la souche mutante *daf-16*.
- Les tests de cancérogénicité ont été réalisés sur un effectif de 1000 individus *gfp-1* exposés au gaz Z.
- Chacune des expositions au gaz a été réalisée une fois.
- Pour chaque exposition, la même expérience a été réalisée en parallèle sur un même effectif d'individus témoins non exposés au gaz (contrôle négatif).

		Pur 15 000 ppmv		Pur 5 000 ppmv	Pur 30 000 ppmv	Après coupure 2 000 ppmv
		N2	<i>daf-16</i>			
Toxicité aigüe		30%	1% mais malformations tardives de la vulve avec mort	5%	53%	7%
Mutagénicité	Taux de mâles	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%
	Phénotypes particuliers	50% des boîtes avec problème de comportement / fuite et 58% des boîtes avec individus morts ou malformés (5/1000)	74% des boîtes avec problème de comportement / fuite et 12% des boîtes avec individus morts ou malformés (0,8/1000)	86% des boîtes avec problème de comportement / fuite et 66% des boîtes avec individus morts ou malformés (6/1000)	68% des boîtes avec problème de comportement / fuite et 58% des boîtes avec individus morts ou malformés (6,2/1000)	28% des boîtes avec problème de comportement / fuite et 18% des boîtes avec individus morts ou malformés (1/1000)
Cancérogénicité		Absence de descendance			Absence de descendance	

Figure 13 : Nombre moyen de descendants par individu lors des différentes expositions au gaz Z

- Pour chacune des expositions au gaz Z, la descendance de 50 individus N2 a été comptée. Est représentée ici la moyenne du nombre de descendants obtenus.
- Pour chaque expérience, le même comptage a été réalisé sur 50 individus N2 contrôles non exposés.



### 3.4 – Etude sur les autres gaz

L'ensemble des résultats obtenus sur les autres gaz sont présentés dans le tableau 6 et la figure 14.

#### 3.4.1 – Gaz HFP à 150 ppmv

##### a) Toxicité aiguë (N=50 individus)

La toxicité à J7 sur les 50 individus isolés est nulle.

##### b) Mutagenicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=5625)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est identique aux individus témoins :  $112,50 \pm 26,46$  contre  $109,96 \pm 23,16$ . Le taux de mâles dans

la descendance est inférieure à 0,1%. Le pourcentage de phénotypes anormaux est négligeable (<0,1%) au vu des effectifs totaux.

### 3.4.2 – Gaz SF6 à 100 000 ppmv

a) Toxicité aigüe (N=50 individus)

Sur les 50 individus testés, aucune toxicité n'a été observée à J7.

b) Mutagenicité (N=50 individus ; Nombre de descendants=8655)

Le nombre de descendants par boîte pour les individus exposés est identique aux individus témoins :  $173,11 \pm 35,83$  contre  $204,86 \pm 36,16$ . Le taux de mâles dans la descendance est inférieur à 0,1%. Le nombre de descendants présentant des phénotypes anormaux est négligeable, représentant seulement 0,03% de la descendance.

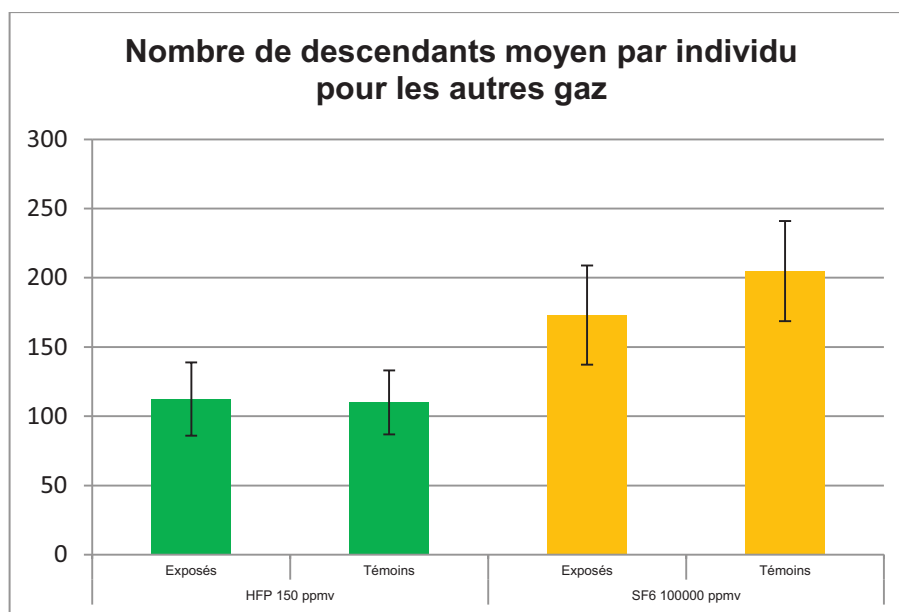
Tableau 6 : Toxicité et mutagenicité des autres gaz

- Les tests de toxicité ont été réalisés sur 50 individus N2.
- Les expériences de mutagenicité ont été réalisées par analyse de la descendance de 50 individus N2 exposés au gaz.
- Chacune des expositions au gaz a été réalisée une fois.
- Pour ces deux expositions, la même expérience a été réalisée en parallèle sur un même effectif d'individus témoins non exposés au gaz (contrôle négatif).

		HFP 150 ppmv	SF6 100 000 ppmv
Toxicité aigüe		0%	0%
Mutagenicité	Taux de mâles	<0,1%	<0,1%
	Phénotypes particuliers	Négligeable	Négligeable
Cancérogénicité			

Figure 14 : Nombre moyen de descendants par individu lors des expositions aux autres gaz

- Lors des expositions aux gaz HFP et SF6, la descendance de 50 individus N2 a été comptée. Est représentée ici la moyenne du nombre de descendants obtenus.
- Pour chaque expérience, le même comptage a été réalisé sur 50 individus N2 contrôles non exposés.



### 3.5 – Dosage des composés fluorés par RMN 19F

Lors de l'expérience réalisée sur le gaz X air sec échauffement / fermeture à 100000 ppmv, un dosage des composés fluorés présents dans les nématodes a été réalisé.

Dans le tube contenant le DMSO d6, on note la formation dans le milieu d'acide trifluoroacétique ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ). Par contre, on n'observe pas la contrepartie de la molécule de départ X qui est du HFC227ea ( $(\text{CF}_3)_2\text{CFH}$ ).

Dans le tube contenant le  $\text{CDCl}_3$ , les analyses RMN 19F ne montrent la présence ni d'acide trifluoroacétique, ni de HFC227ea.

La même procédure réalisée sur les boîtes témoins n'a pas révélé d'acide trifluoroacétique et de HFC227ea.

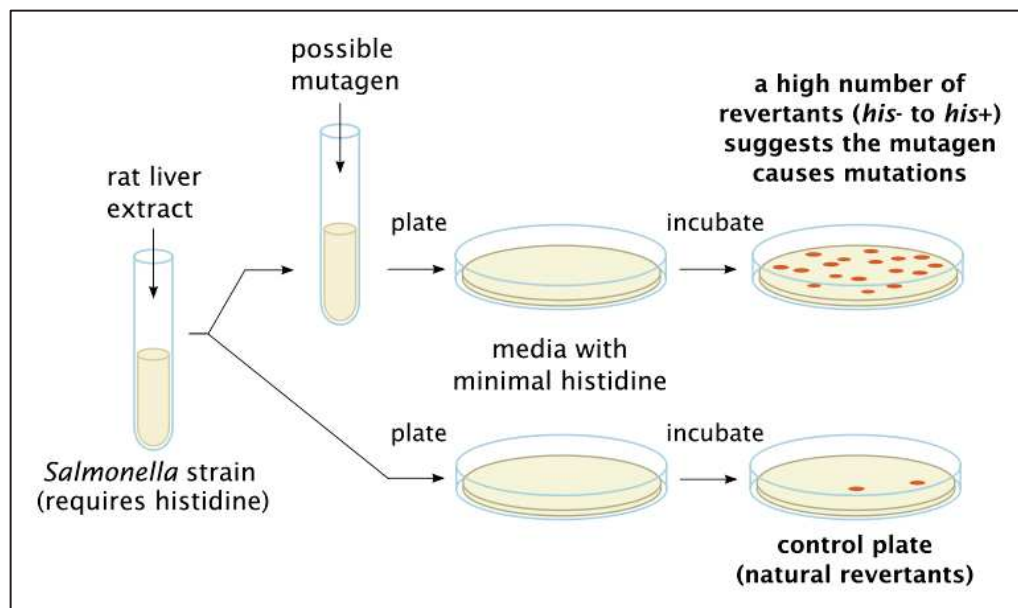
#### 4. Discussion et conclusion

Ce travail sur les gaz à l'aide du modèle quantitatif de toxicologie *C. elegans* a pour but d'étudier l'impact physiologique de gaz sur un modèle complet. Il nous a permis de tester à la fois leur toxicité aiguë, leur mutagénicité et leur cancérogénicité.

Un témoin négatif a été mis en œuvre avec le gaz SF6 qui ne présente ni toxicité, ni mutagénicité à une concentration élevée de 100000 ppmv (tableau 6).

Un témoin positif a été recherché. Cependant, les gaz ont été très peu étudiés en termes de toxicité et mutagénicité jusqu'à présent. Aucune expérience similaire sur un gaz prouvé mutagène n'a été réalisée précédemment. Le seul test de mutagénicité utilisé actuellement sur les gaz est le test de Ames (figure 15). Ce test, dans le cas des gaz, n'est pourtant absolument pas révélateur. En effet, ces gaz fluorés ne sont pas miscibles à l'eau. Or, le test de Ames est réalisé en milieu aqueux.

Figure 15 : Principe du test de Ames



Cependant, avec le modèle *C. elegans*, un produit mutagène a déjà été testé à de nombreuses reprises. Il s'agit de l'Ethyl méthanesulfonate (Hartman et al., 2014). Cette expérience de mutagénicité a été réalisée à de nombreuses reprises et dans de nombreuses conditions depuis 1974 (Brenner, 1974). Le modèle nématode semble donc approprié pour de telles études de mutagénicité.

Les travaux réalisés sur les gaz ont permis de déterminer que le gaz X air sec échauffement fermeture présente une forte toxicité à 100000 ppmv et provoque un

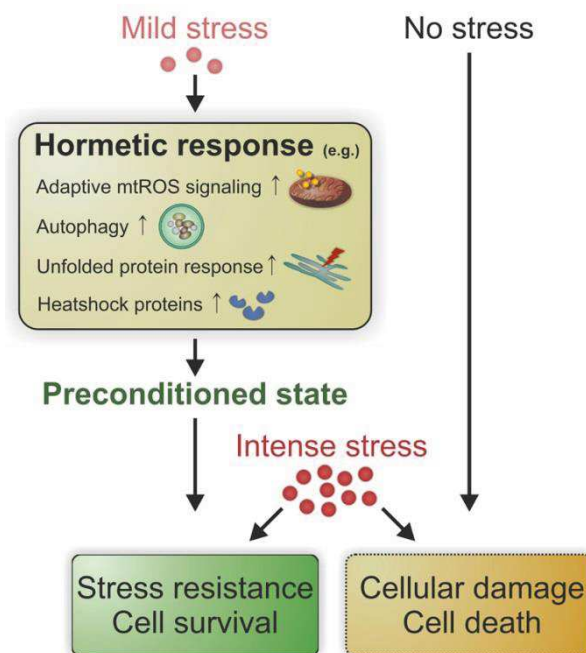
phénomène de dispersion des vers et une forte mutagénicité à 160000 ppmv (tableau 3).

Un effet dose réponse sur ce gaz n'est pas observé. Cela peut être expliqué par le mécanisme hormétique existant chez *C. elegans*. En effet, l'hormèse désigne une réponse de stimulation des défenses biologiques, généralement favorable, à des expositions de doses de toxines ou d'autres agents générateurs de stress. À cause de ce mécanisme, un agent polluant ou toxique peut avoir un effet opposé suivant que la dose reçue est faible ou forte (figure 16). Ce genre de mécanisme a été décrit chez les bactéries, les levures, les mouches, les souris (Zimmermann et al., 2014) et plus particulièrement chez le nématode *C. elegans* (Cypser et al., 2006 ; Rodriguez et al., 2012).

Concernant le phénomène de fuite ou dispersion à 100000 ppmv, de tels comportements ont été observés lors d'une étude sur les gaz anesthésiants (Morgan et al., 2007). Dans ce travail, l'exposition à des gaz anesthésiants a entraîné une dispersion radiale des nématodes en bord de boîte. Une mutation des protéines neuronales (effet présynaptique) est à l'origine de ce phénomène.

Le gaz X air sec échauffement fermeture à cette dose de 100000 ppmv pourrait donc exercer des effets neurotoxiques sur *C. elegans*.

Figure 16 : Mécanisme hormétique (Zimmermann et al., 2014)



Notre travail sur le gaz X pur n'a montré ni toxicité ni mutagénicité à 20000 ppmv. Par contre, à 26000 et 32000 ppmv, une formation importante de « bulles » dans les vers a été observée, une toxicité aigüe et une mutagénicité. Les résultats observés montrent une réponse dose dépendante (tableau 3).

Le gaz HFP ne présente ni toxicité, ni mutagénicité à la concentration de 150 ppmv. Ce sous-produit n'est donc pas responsable de la toxicité ou de la mutagénicité du gaz X air sec après échauffement fermeture (tableau 6).

Par ailleurs, l'analyse par RMN montre que les nématodes métabolisent le X air sec échauffement / fermeture de la même façon que les souris. En effet, le seul métabolite fluoré retrouvé par cette analyse est identique à celui mis en évidence sur les rongeurs, à savoir l'acide trifluoroacétique.

Chez les souris, un autre composé a été retrouvé. Il s'agit du HFC227ea ((CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CFH). Cependant, ce gaz, sous forme gazeuse, à température ambiante (son point d'ébullition est à environ -16°C), est faiblement soluble en milieu aqueux. C'est probablement pour cela qu'on ne le détecte pas dans les échantillons. Une perspective serait de récupérer le gaz dans l'enceinte au bout des 4h d'exposition et de l'analyser afin de pouvoir détecter le HFC227ea.

Une forme hydratée toxique du gaz existe. La toxicité de X pourrait donc venir de cette forme hydratée. En effet, le gaz, au contact des nématodes pourrait s'hydrater et le produit hydraté serait lui-même toxique. De plus, une formation de radicaux libres à partir de la molécule de X a été évoquée par les chimistes de S3F Chimie. Ces radicaux libres pourraient créer des lésions de l'ADN, d'où la mutagénicité observée.

Concernant l'étude de la cancérogénicité de ce gaz X, des études complémentaires sont nécessaires. En effet, bien que l'on n'ait pas observé de descendance chez les individus *glp-1* exposés au X air sec échauffement / fermeture à 160000 ppmv, des problèmes de malformations de la vulve ont été détectés (1% des individus exposés). Ce nombre significatif et le fait que ces malformations touchent précisément la vulve n'autorisent pas de conclure à l'absence de cancérogénicité du gaz. Il est à noter que ce même type de malformations a été mis en évidence par une équipe travaillant sur l'effet cancérogène de rayonnements gamma sur ce modèle de nématode à l'IRSN.

Le second gaz testé comme alternative au SF<sub>6</sub> est le gaz Y. Ne présentant ni toxicité, ni mutagénicité, il fait un bon candidat (tableau 4). Malheureusement, ses propriétés diélectriques ne semblent pas suffisantes pour qu'il soit retenu par les industriels comme remplaçant au SF<sub>6</sub>. C'est pourquoi une seule concentration a été testée.

Le troisième gaz étudié, à savoir le gaz Z, a un double effet en termes de toxicité (tableau 5). Il a tout d'abord un effet immédiat avec une toxicité aigüe à J7 de 5% à 5000 ppmv, 30% à 15000 ppmv et 53% à 30000 ppmv sur la souche sauvage. On observe ici un effet dose réponse. Mais il a également un effet retard avec des malformations et une mortalité qui apparaissent dans un second temps, à partir de J7, sur la souche mutée *daf-16*, à 15000 ppmv. La toxicité immédiate passe donc par l'une des voies qui n'existe plus chez le mutant *daf-16* et la toxicité différée par une voie commune aux nématodes *daf-16* et N2.



Concernant la cancérogénicité du gaz Z, l'exposition des nématodes *glp-1* à des doses de 15000 et 30000 ppmv ne permet pas de conclure à un effet cancérigène de ce gaz à ces doses.

D'un point de vue mutagénicité, les différentes expositions ont révélé un phénomène de fuite, de dispersion très important (tableau 5). Ce mécanisme reflète un effet potentiellement neurotoxique du gaz. Il a été décrit pour des gaz anesthésiants (Morgan et al., 2007). Ce phénomène n'est pas de la mutagénicité au sens strict, c'est-à-dire une mutation d'un gène sur une base codante de l'ADN, mais une modification épigénétique. Cet effet sera pourtant transmis à la descendance sur plusieurs générations mais pas suivant les lois de Mendel.

Nous pouvons conclure de l'ensemble de cette étude qu'aucun des gaz testés jusqu'à maintenant ne semble convenir pour remplacer le gaz SF6. En effet, bien que présentant les problèmes de gaz à effet de serre, le SF6 est non toxique et non mutagène. Ce que l'on ne peut pas conclure des autres gaz.

Le gaz X est toxique et mutagène. De nombreux phénotypes particuliers et malformations ont été observés.

Le gaz Y semble beaucoup plus intéressant en termes de toxicité et mutagénicité. Cependant, ses médiocres propriétés diélectriques ne font pas de lui un candidat de choix pour remplacer le gaz SF6.

Le gaz Z, quant à lui, présente une double toxicité avec une toxicité immédiate mais également une toxicité différée avec une apparition plus tardive de malformations. Ce gaz est de plus potentiellement neurotoxique, entraînant un phénomène de fuite très important sur la descendance.

Ces résultats, obtenus sur le modèle *C. elegans*, ont été confortés par le modèle souris sur lequel les études de toxicité ont été menées en parallèle par « l'équipe rongeur ». Le dosage des métabolites par RMN lors de l'exposition au gaz X a donné les mêmes résultats sur nos deux modèles. De plus, l'effet toxique du gaz X et le double effet toxique du gaz Z ont également été confirmés. Sur les souris, le gaz X semble impacter principalement le système respiratoire avec une toxicité nette sur les rongeurs qui meurent très rapidement ou se rétablissent. Dans le cas du gaz Z, des souris vont mourir immédiatement mais d'autres vont rester en souffrance plus longtemps voire même se rétablir pour rechuter brutalement quelques jours plus tard. Les deux modèles nématodes et souris sont donc complémentaires. Et la compatibilité des résultats montre l'utilité et la pertinence du modèle *C. elegans* pour les études en toxicologie.

**III - ETUDE SUR LA RESPIRATION  
SEAHORSE**



## 1. Introduction

Les mitochondries jouent un rôle important dans la viabilité cellulaire, l'apoptose (Susin et al., 1999), la signalisation rétrograde (Liu et Butow, 2006), la signalisation du calcium (Nicholls, 2005), le cycle de Krebs (Fornie et al., 2004) et dans le vieillissement (Balaban et al., 2005). Il a été montré que la vitesse de vieillissement est directement proportionnelle au métabolisme énergétique (Speakman, 2005). L'importance des mitochondries pour les organismes vivants est mise en relief par le fait que les dysfonctionnements de la mitochondrie entraînent directement une myriade de maladies humaines affectant au moins 1 individu sur 5000 (Schaefer et al., 2004) et contribuent à énormément d'autres (Johannsen et Ravussin, 2009 ; Taylor et Turnbull, 2005). De plus, de nombreuses drogues (Neustadt et Pieczenik, 2008) et polluants (Meyer et al., 2013) créent des dysfonctionnements de la mitochondrie. Cela met l'accent sur la nécessité d'une meilleure compréhension des modifications génétiques et environnementales sur la mitochondrie *in vivo*.

Les expériences sur organismes entiers sont importantes car les signaux intercellulaires et le contexte cellulaire n'est pas présent sur les expériences *in vitro* (McBride et al., 2006).

*C. elegans*, avec ses nombreux avantages d'organisme modèle, permet donc cette étude.

Le *Seahorse XFe24 Analyser* (Seahorse Bioscience, Massachusetts, USA) est un appareil qui mesure le taux de consommation d'oxygène OCR (Oxygen Rate Consumption) et le taux d'acidification extracellulaire ECAR (Extracellular Acidification Rate) sur cellules vivantes dans des plaques 24 puits. Cet outil permet de calculer en temps réel les OCR et les ECAR. Il offre ainsi la possibilité d'étudier des fonctions cellulaires clés telles que la respiration mitochondriale et la glycolyse.

### **Principe de la mesure**

Le *Seahorse XFe24 Analyser* mesure le taux d'oxygène dissous dans le milieu entourant les cellules directement dans la microplaque. Tout changement de ce taux est dû à une consommation ou une production d'oxygène par les cellules. Les mesures sont réalisées en isolant un petit volume (moins de 10µl) de milieu. Le métabolisme cellulaire crée des changements rapidement détectables dans ce type de volume. Entre chaque mesure, une homogénéisation du milieu a lieu. Les mesures sont réalisées en utilisant 24 biocapteurs fluorescents optiques contenus dans une microplaque stérile. Les consommations sont exprimées en pmol/min. Cette mesure étant non invasive, les cellules peuvent être suivies sur de longues périodes (minutes, heures ou jours).

Une autre version de cet appareil, le *Seahorse XFe96 Analyser* a été développé plus récemment. Il repose sur le même principe mais travaille avec des microplaques 96 puits.

Le *Seahorse XFe24* a, dans un premier temps, été créé pour travailler sur les cellules. Depuis, il a été utilisé dans de nombreux domaines dont la sénescence, la cancérologie, le métabolisme cellulaire, les maladies mitochondriales,... et sur des organismes entiers. La consommation d'oxygène a été mesurée avec cet outil, pour la première fois, chez *C. elegans*, par Dancy et al. en 2013. Il a ensuite été employé pour différentes études sur le fonctionnement mitochondrial (Andreux et al., 2014 ; Luz et al., 2015) et le rapport entre mitochondries et longévité chez *C. elegans* (Mouchiroud et al., 2013).

Cependant, aucun de ces travaux n'a étudié, à grande échelle et sur un effectif important d'individus, les mutants de la chaîne respiratoire mitochondriale chez *C. elegans*.

Dans ce travail est décrite la mesure de la consommation basale en oxygène sur l'organisme *C. elegans* en utilisant le *Seahorse XFe24 Analyser* sur différentes souches de nématodes : la souche sauvage N2, différents mutants de la chaîne respiratoire mitochondriale (*mev-1(kn1)*, *isp-1(qm150)*, *clk-1(qm30)*) et un mutant de la voie AAK-2 (*aak-2(ok524)*).

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1 – Culture de *Caenorhabditis elegans***

La méthode de culture de *C. elegans* utilisée pour cette étude est celle décrite précédemment, à savoir une culture à 20°C sur un milieu NGM-agar avec, comme source de nourriture, des bactéries *E. coli* HT115(DE3). La synchronisation des populations a été réalisée par la méthode de bleach.

La souche sauvage de nématode est la souche N2 Bristol. Les souches mutantes utilisées sont : *isp-1(qm150)*, *mev-1(kn1)*, *clk-1(qm130)* et *aak2(ok524)*. Toutes ces souches proviennent du CGC.

### **2.2 – Préparation des échantillons**

Toutes les expériences ont été réalisées sur des nématodes synchronisés au stade L4 / jeune adulte. Les L4 cultivés sur boîte NGM-agar sont récupérés dans du milieu M9 et placés dans des tubes stériles de 15 ml. Les échantillons sont rincés deux fois au M9 afin de supprimer toute trace de bactéries. 50 nématodes sont placés dans les puits de la plaque *Seahorse XFe24*. Le volume final dans chaque puit est de 500 µl. Pour chaque souche de nématodes, 2 à 6 plaques *Seahorse XFe24* (répliquats « externes ») ont été réalisés et pour chaque plaque, quatre à cinq puits ont été préparés (répliquats « internes »). De plus, sur chaque plaque *Seahorse XFe24*, minimum 4 puits « blancs » ont été effectués. Ils contiennent chacun 500 µl de milieu M9 stérile.

#### **2.2.1 – Seahorse workflow**

La mesure du taux de consommation d'oxygène chez les différentes souches de *C. elegans* a été effectuée à l'aide de l'appareil *Seahorse XFe24 Analyser 24* puits (*Seahorse Bioscience*).

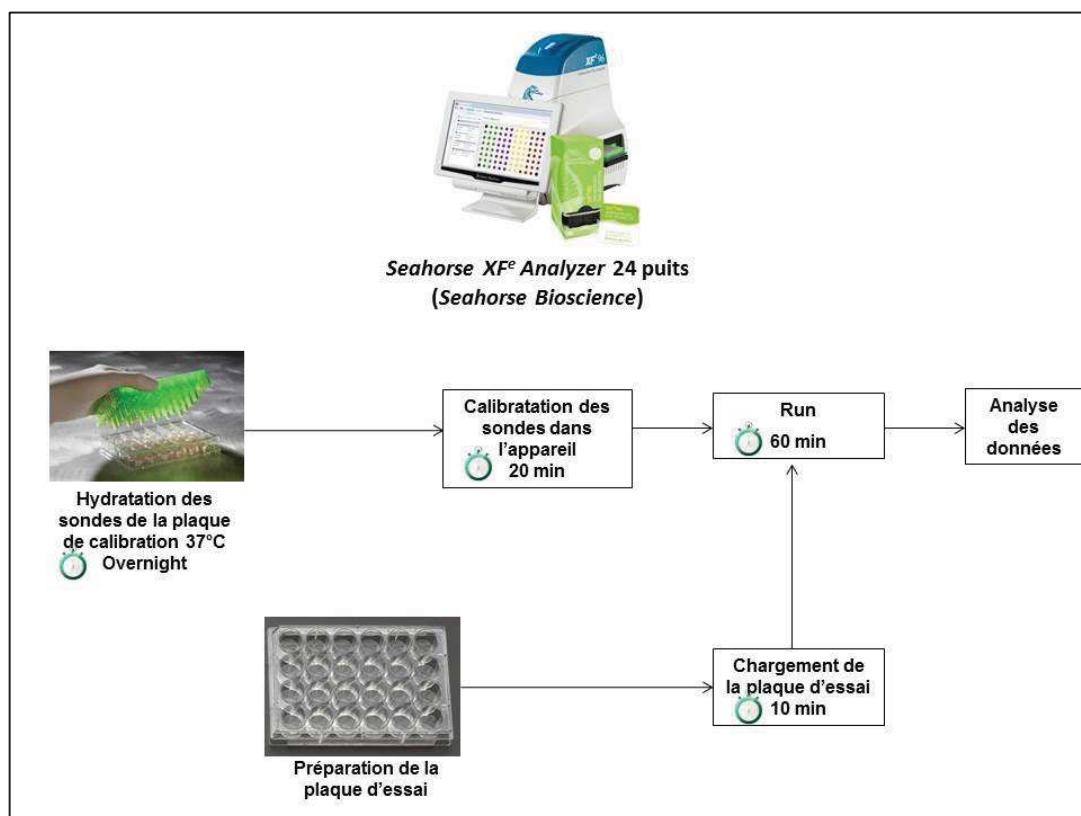
Pour chacune de nos expériences, le protocole décrit sur la figure 17 a été mis en place.

Le programme utilisé est le suivant :

- 1- calibrate probes;
- 2- loop 10 times;
- 3- mix 2 min;
- 4- time delay 2 min;
- 5- measure 2 min;
- 6- loop end.

La température interne de l'appareil a été réglée à 20°C.

Figure 17 : Présentation du Seahorse workflow



### 2.2.2 – Analyse des résultats

Une moyenne du background-corrected OCR (pMol O<sub>2</sub>/min) entre les différentes mesures de blancs est calculée puis les mesures d'OCR sont normalisées en fonction du nombre d'individus dans chaque puit. La moyenne et l'écart-type des OCR par nématode sont calculés entre les répliquats pour chaque condition. Un taux de variation est attendu entre les mesures, plaques, puits et jours. C'est pourquoi chaque expérience a été réalisée plusieurs fois. Les résultats sont exprimés en valeur relative par rapport à la souche sauvage N2.

### 3. Résultats et discussion

A partir des résultats *Seahorse* bruts obtenus, la consommation en oxygène par individu pour chacune des souches a pu être calculée. Des variations inter-manipulations ont été observées. Ces variations normales sont dues à un certain nombre de paramètres dont la température dans l'appareil ou encore la taille des individus.

En effet, bien que le *Seahorse XFe24* ait été réglé à une température interne de 20°C, l'appareil n'a pas de système de refroidissement interne. La température lors des différentes mesures a donc varié en fonction de la température de la pièce et du temps d'utilisation de l'appareil. Celle-ci a oscillé pour les différentes mesures entre 26,7°C et 30,6°C.

De même, une synchronisation des individus a été réalisée lors de chaque expérience afin d'utiliser toujours des nématodes au stade L4 / jeunes adultes. Cependant, de légères variations dans la synchronisation des expériences ont pu faire que la taille des vers ne peut être strictement identique d'une manipulation à une autre.

Afin de supprimer ces artéfacts liés aux expériences, la valeur des OCR a été transformée en valeur relative par rapport à la valeur de référence des nématodes souche sauvage N2. L'ensemble des résultats sont présentés tableau 7.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 18, les 3 mutants mitochondriaux ainsi que le mutant *aak-2* ont une consommation en oxygène significativement supérieure à la souche N2.

Luz et al. en 2015 n'ont pas montré dans leur étude de différence significative de consommation en oxygène entre la souche sauvage N2 et la souche mutante *isp-1*. Cependant, leur travail, réalisé lui aussi avec le *Seahorse*, n'a été fait que sur un effectif réduit d'individus : n= 37 pour la souche N2 et n=49 pour les mutants *isp-1*.

D'autres études ont également été menées sur des souches mutantes de nématodes (Feng et al., 2001 ; Ng et al., 2014). Mais dans ces travaux, une autre technique a été utilisée. Il s'agit des électrodes de Clarks. Ils n'ont pas travaillé sur un nombre de nématodes précis comme dans notre cas mais sur une quantité de protéines. Ces deux types d'études ne sont donc pas comparables.

Nos valeurs de référence, obtenues sur un grand nombre d'individus et à partir de plusieurs répliquats internes et externes nous permettront dans le futur d'utiliser l'outil *Seahorse* pour des études de toxicologie ou de mécanistique.

Tableau 7 : Présentation des effectifs, de la mesure des OCR par individus et de sa mesure relative par rapport à la souche N2 pour chacune des souches de *Caenorhabditis elegans*

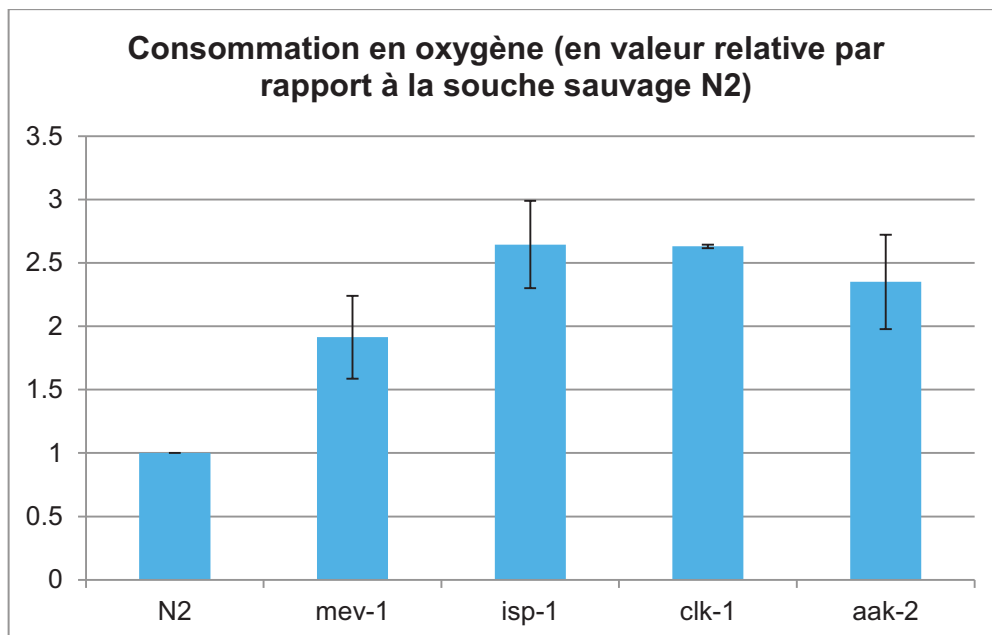
Expérience	N2			mev-1			isp-1		
	Effectif	OCR (pMol/min/individu)	OCR (valeur relative)	Effectif	OCR (pMol/min/individu)	OCR (valeur relative)	Effectif	OCR (pMol/min/individu)	OCR (valeur relative)
1	110	2.110 ± 0.009	1	100	4.512 ± 0.354	2.14	210	6.469 ± 0.788	3.07
2	150	3.471 ± 0.207	1						
3	205	1.035 ± 0.085	1						
4	255	1.201 ± 0.113	1	285	1.736 ± 0.043	1.44	250	2.764 ± 0.047	2.3
5	250	1.128 ± 0.135	1	240	1.759 ± 0.085	1.56	240	2.532 ± 0.191	2.44
6	150	1.517 ± 0.029	1	365	3.278 ± 0.028	2.16			
7	290	2.029 ± 0.095	1	375	4.117 ± 0.130	2.03			
8	200	2.192 ± 0.217	1	200	4.721 ± 0.133	2.15			
Moyenne			1			1.913333333			2.645
Ecart-type			0			0.325801576			0.345108679
Effectif Total	1610			1565			960		

Expérience	clk-1			aak-2		
	Effectif	OCR (pMol/min/individu)	OCR (valeur relative)	Effectif	OCR (pMol/min/individu)	OCR (valeur relative)
1						
2				210	8.456 ± 1.022	2.44
3				265	2.768 ± 0.065	2.67
4				245	2.331 ± 0.044	1.94
5						
6	85	3.998 ± 0.236	2.64			
7						
8	200	5.742 ± 0.241	2.62			
Moyenne			2.63			2.35
Ecart-type			0.014142136			0.373229152
Effectif Total	285			720		

Figure 18 : Consommation relative en oxygène des différentes souches étudiées

Données établies à partir de :

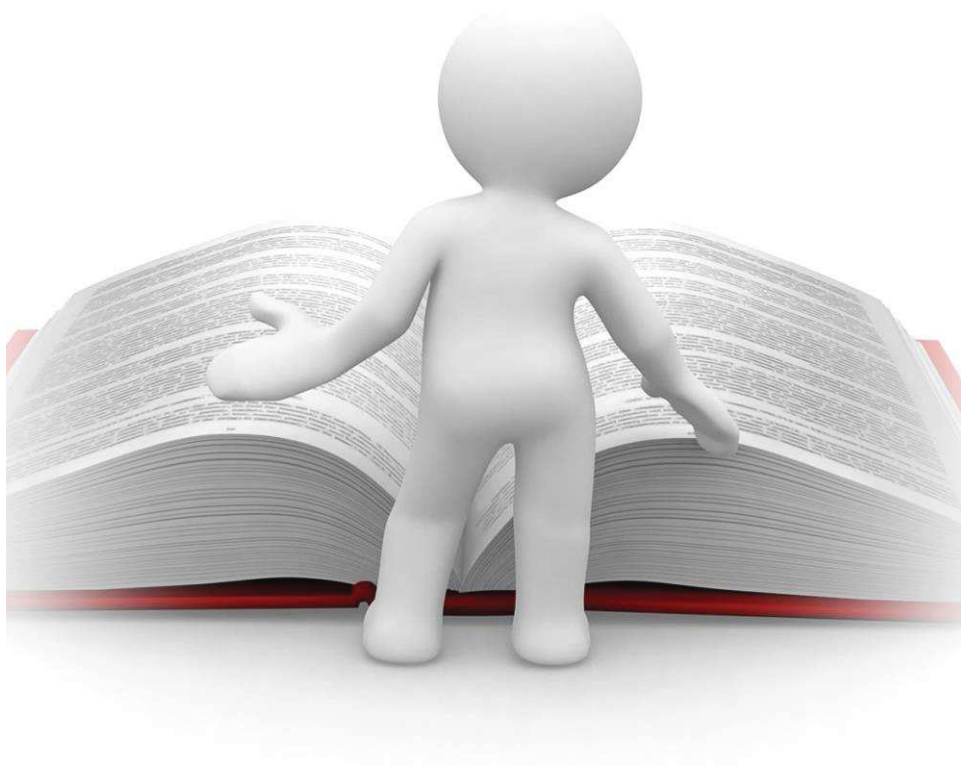
- 8 répliquats pour la souche N2 (N=1610 individus)
- 6 répliquats pour la souche *mev-1* (N=1565 individus)
- 4 répliquats pour la souche *isp-1* (N=960 individus)
- 2 répliquats pour la souche *clk-1* (N=285 individus)
- 3 répliquats pour la souche *aak-2* (N=720 individus)





***PARTIE II : LE MODELE TARDIGRADE***  
***HYPHSIBIUS DUJARDINI***

# ***I - ETAT DES CONNAISSANCES***



## **1. Les tardigrades et l'espèce *Hypsibius dujardini***

Le nom tardigrade signifie marcheur lent en latin. Ces petits animaux ont été nommés ainsi par Spallanzani en 1776 (Rebecchi et al., 2007) mais ont été découverts en 1773 par Goeze, un zoologiste allemand qui les appelait « Kleiner wasserbär » ou « Water bear ».

Dans les années 1960's, Sydney Brenner a hésité entre le modèle *Caenorhabditis elegans* et le tardigrade comme sujet d'étude (Gabriel et al., 2007). Il a finalement choisi le nématode car celui-ci possède moins de neurones (Brenner, 2001).

Les tardigrades sont pourtant des sujets d'études intéressants pour les questions de résistance car ils sont capables de survivre à des conditions extrêmes.

De plus, comme *C. elegans*, l'espèce de tardigrade *Hypsibius dujardini* présente des caractéristiques favorables en tant que modèle d'études : optiquement claire, méthode de culture relativement simple, cycle de vie court et mode de reproduction principalement parthénogénétique.

### **1.1 – Phylogénie**

De récentes avancées en biologie moléculaire et phylogénie suggèrent que deux organismes modèles très connus *C. elegans* (un nématode) et *Drosophila melanogaster* (un arthropode) sont beaucoup plus proches l'un de l'autre que ce que l'on croyait jusqu'à maintenant et sont également très proches des tardigrades (Aguinaldo et al. 1997 ; Campbell et al., 2011 ; Copley et al., 2004 ; Dopazo et Dopazo, 2005 ; Giribet et Ribera, 1998 ; Peterson et Eernisse, 2001) (figure 19). Ces trois phyla font partie des Ecdysozoa, un des deux membres du superclade des protostomiens (Aguinaldo et al., 1997). Une représentation des Ecdysozoa est présentée figure 20.

L'étude de Gross et Mayer en 2015, basée sur le développement neuronal des tardigrades et plus particulièrement de l'espèce *H. dujardini*, a confirmé cette représentation en montrant que les tardigrades sont un groupe sœur des arthropodes.

Figure 19 : Position des Tardigrades dans « the Tree of Life » (Dunn et al., 2008)

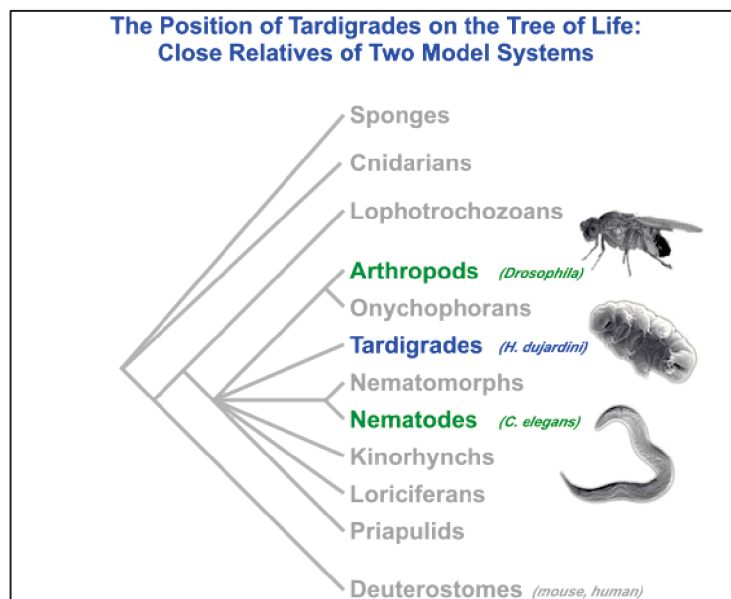
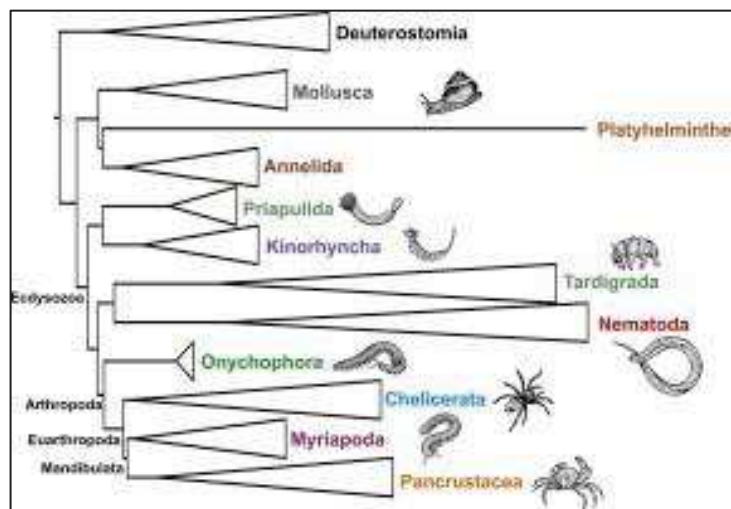


Figure 20 : Phylogénie des Ecdysozoa (Borner et al., 2014)



## 1.2 – Taxonomie

La taxonomie sur critères morphologiques des tardigrades repose principalement sur les griffes, l'appareil buccal et pharyngé, la cuticule et les œufs (Nelson et marley, 2000).

Sur la base de caractères morphologiques et plus particulièrement en fonction de leur cuticule, ce phylum est divisé en deux classes :

- les hétérotardigrades : cuticule divisée en plaques,
- les eutardigrades : cuticule lisse.

Une troisième classe, les mésotardigrades (Rahm, 1937), repose sur une espèce unique, *Thermozodium esakii*. Cette classe a un statut douteux car le spécimen type n'existe plus et sa localité de description, une source chaude au Japon, a été détruite par un tremblement de terre. Les recherches sur cette espèce sont depuis restées infructueuses (Nelson, 2002).

### **1.3 – Ecologie**

Les tardigrades forment un groupe cosmopolite. Ils sont retrouvés partout dans le monde (Mc Innes, 1994 ; Mc Innes et Pugh, 1998) et dans de nombreux environnements : marin, eaux douces, lichens, plantes en décomposition, films d'eau ou mousses (Kinchin, 1994 ; Ramazzotti et Maucci, 1983). Même si tous les tardigrades ont besoin d'eau pour être actifs, leur environnement est généralement divisé en 3 catégories :

- marins,
- eaux douces,
- terrestres.

Des fossiles datant du Cambrien suggèrent qu'il s'agit d'un phylum très ancien (Maas et Waloszek, 2001 ; Müller et al., 1995).

Environ mille espèces de tardigrades ont été décrites à ce jour (Degma, Bertolani et Guidetti, 2015 ; Degma et Guidetti, 2007 ; Guidetti et Bertolani, 2005). Elles se répartissent en 300 formes marines, 100 espèces d'eaux douces et 600 espèces terrestres. Probablement que plusieurs autres milliers sont encore à découvrir (Guil et Cabrero-Sanudo, 2007).

### **1.4 – L'espèce *Hypsibius dujardini***

*H. dujardini* est une espèce cosmopolite vivant dans les mousses, en eaux douces. Cette espèce a été découverte par le biologiste français Félix Dujardin. Elle fait partie des Eutardigrades, les tardigrades à cuticule lisse.

### **1.5 – Anatomie**

Les tardigrades sont de petits animaux transparents dont la taille varie de 0,1 à 1,2 mm (figure 21).

On les surnomme parfois « oursons d'eau » à cause de leurs déplacements lents et de leur morphologie.

Ils ont un nombre de cellules petit et constant, un seul plan corporel et une symétrie bilatérale (Kinchin, 1994).

Les tardigrades forment un groupe monophylétique caractérisé par 5 parties : une tête et 4 segments corporels, chacun constitué de ganglions, muscles et d'une paire de pattes non articulées portant de grosses griffes (Nelson, 2002). Ils possèdent un

appareil et un canal digestif complet. Leur bouche est suivie d'un pharynx, d'un œsophage, d'un estomac, d'un intestin et d'un cloaque. Leur système nerveux consiste en une chaîne dorsale lobée et une corde nerveuse ventrale avec des paires de ganglions fusionnés (Dewel et Dewel, 1996 ; Wierderhoft et Greven, 1996). Leur corps est rempli d'un fluide en contact avec toutes les cellules, assurant ainsi une nutrition efficace et des échanges gazeux, sans recours à des appareils circulatoires et respiratoires (figure 22). Le corps des tardigrades est recouvert d'une cuticule robuste mais souple, qu'ils rejettent en grandissant (mues) (figure 23).

Figure 21 : Image d'un tardigrade *Hypsibius dujardini* en Nomarski (photo réalisée avec un microscope confocal SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany)



Figure 22 : Coupe transversale d'un tardigrade femelle (Miller, 2011)

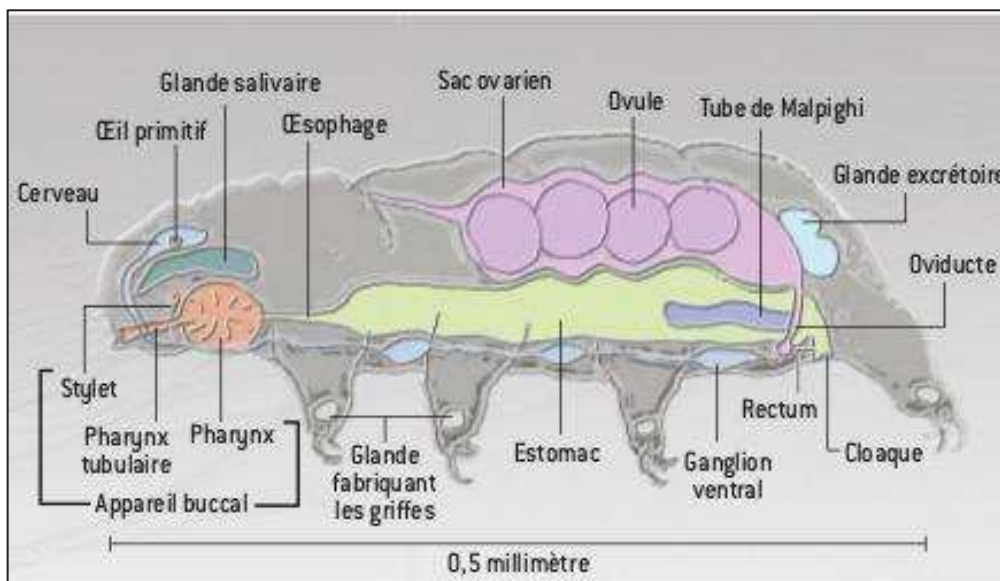


Figure 23 : Image d'une mue d'*Hypsibius dujardini* en Nomarski (photo réalisée avec un microscope confocal SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany)



### 1.6 – Reproduction et génétique

Les embryons d'*H. dujardini* sont clairs et transparents, ce qui permet d'étudier leur développement en microscopie (figure 24).

Les modes de reproduction des tardigrades incluent reproduction sexuée et parthénogénèse (Bertolani, 1987 ; Bertolani et Rebecchi, 1999 ; Rebecchi et Bertolani, 1988 ; Rebecchi et Nelson, 1998). Tandis que des mâles ont été décrits dans la nature, tous les *H. dujardini* en culture sont parthénogénétiques. Tous les embryons retrouvés sont des femelles diploïdes (Ammermann, 1967 ; Ramazzotti et Maucci, 1983). La reproduction des femelles est liée aux mues et 1 à 10 œufs sont retrouvés dans l'exuvie (Gabriel et al., 2007 ; Ramazzotti et Maucci, 1983). La ponte demande généralement 5 à 10 jours et apparaît périodiquement toute la vie du tardigrade (Walz, 1982). Les embryons éclosent environ 4 jours après la ponte. Le cycle de vie complet d'*H. dujardini* est court avec un temps de génération de 13 à 14 jours à température ambiante (Gabriel et al., 2007). Même si la croissance des tardigrades est plus rapide durant ses premières mues, elle continue après la maturité sexuelle. La durée de vie des tardigrades actifs est estimée entre 3 et 30 mois (Ramazzotti et Maucci, 1983). Mais cette durée de vie peut être largement augmentée par des périodes de latence. Ramazzotti et Maucci en 1983 ont conclu que dans la nature, chez *Hypsibius*, les individus d'eau douce pouvaient vivre 1 à 2 ans alors que ceux des mousses de 4 à 12 ans.

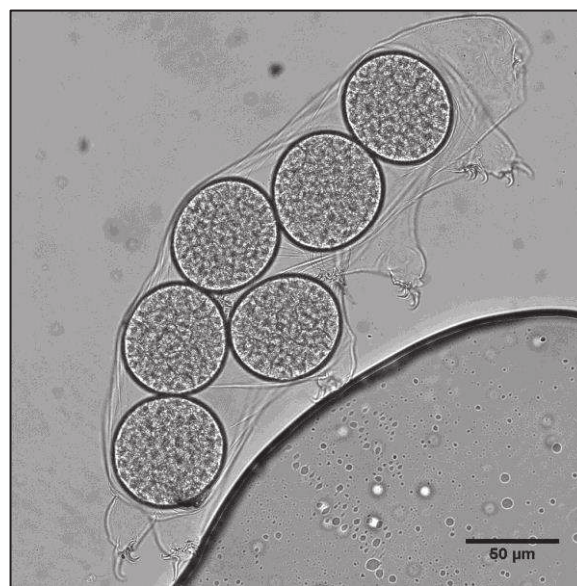
*H. dujardini* possède 5 paires de chromosomes (Ammermann, 1967). Son génome a été estimé dans un premier temps à environ 75 Mb (Gabriel et al., 2007) et plus récemment par la technique Illumina à  $109 \pm 18$  Mb (Bemm et al. 2016). Son séquençage est actuellement soumis à controverse. En effet, le travail de Boothby et al. en 2015, fournissant le premier séquençage complet d'*H. dujardini* et montrant un transfert horizontal de gènes, a été mis en défaut par d'autres équipes. Celles-ci ont montré la présence de contaminations par diverses méthodes (Arakawa, 2016 ;

Bemm et al., 2016 ; Delmont et Eren, 2016 ; Koutsovoulos et al., 2016). Le génome de 20 autres espèces de tardigrades a également été analysé mais aucun n'est aussi compact que celui d'*H. dujardini*.

Des protocoles de cryoconservation, microscopie et immunostaining ont été mis au point (Gabriel et al., 2007 ; Gabriel et Goldstein, 2007).

L'ARNi est un outil robuste pour l'extinction de gènes dans de nombreux organismes, incluant les nématodes et les arthropodes (Cerutti et Casas-Mollano, 2006 ; Hannon, 2002). Cet outil fonctionne également chez *H. dujardini* (Tenlen et al., 2013).

Figure 24 : Image d'embryons d'*Hypsibius dujardini* dans une mue en Nomarski (photo réalisée avec un microscope confocal SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany)

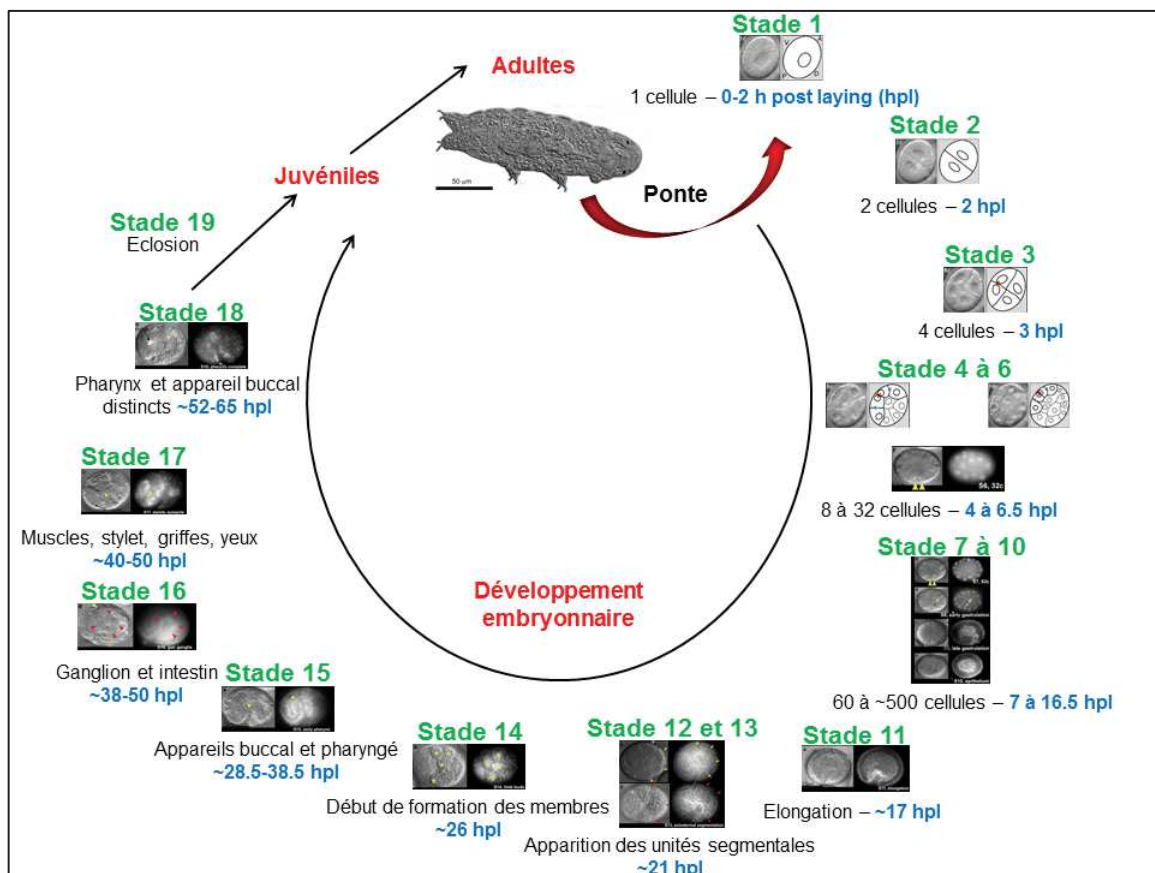


### 1.7 – Cycle de vie

Trois articles importants sur le développement embryonnaire des tardigrades ont été publiés avant 1930 (Marcus, 1929 ; Von Erlanger, 1895 ; Von Wenck, 1914). Ces publications décrivaient un développement normal à partir d'embryon fixés. Plus récemment, des images en microscopie électronique à transmission avec les différents stades de développement des tardigrades ont été publiées (Eibye-Jacobsen, 1997). En 2007, l'article de Gabriel et al. a décrit le lignage cellulaire des embryons d'*H. dujardini*, leur division cellulaire asymétrique et leur migration cellulaire. Le développement d'*H. dujardini* a ainsi été décrit selon des séries de stades embryonnaires. L'observation des embryons au microscope à contraste interférentiel (DIC) et par DAPI par Gabriel et al. en 2007 a permis de fournir une description de leur développement embryonnaire. Celui-ci est présenté figure 25.



Figure 25 : Cycle de vie d'*H. dujardini* d'après Gabriel et al., 2007.



### 1.8 – Forme de résistance

Crowe en 1975 a identifié 5 types de latence chez les tardigrades : anhydrobiose, cryobiose, anoxybiose, osmobiose et enkystement (figure 26). Ces stratégies de latence peuvent être divisées en deux catégories : diapause et quiescence. En diapause, des contrôles endogènes sont induits par des facteurs environnementaux et sont maintenus et achevés par une réponse physiologique interne (Hand, 1991). En quiescence, des contrôles exogènes sont induits et maintenus par des facteurs environnementaux et prennent fin lorsque les conditions sont à nouveau favorables (Hand, 1991 ; Keilin, 1959). Chez les tardigrades, la cryptobiose représente la quiescence et l'enkystement correspond à la diapause (Guidetti et al., 2011).

En cas de dessiccation du milieu, les *H. dujardini* forment des tonnelets, des « tun », leur permettant de résister à la déshydratation.

Quand le tardigrade est en latence, métabolisme, croissance, reproduction et senescence sont diminués ou arrêtés temporairement et la résistance aux conditions environnementales extrêmes est augmentée. Ces phases de latence ont un impact sur le rôle écologique des tardigrades (Kinchin, 1994 ; Wright et al, 1992).

En 1997, Ricci et Pagani ont proposé 3 hypothèses sur les effets de l'anhydrobiose sur le vieillissement des nématodes.

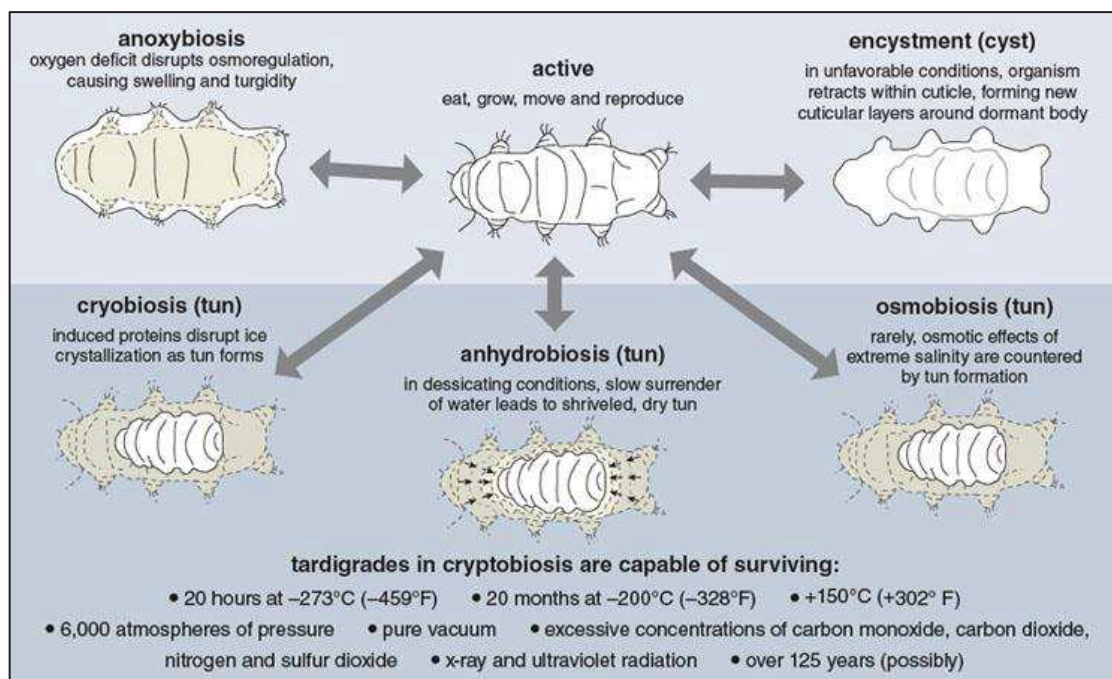
Le premier modèle est appelé « sleeping beauty ». Il postule que la totalité du temps passé en anhydrobiose n'est pas décompté de la durée de vie des nématodes.

Le second modèle décrit un comptage partiel. Ainsi, l'âge physiologique est diminué mais pas en totalité.

Le troisième modèle ne décrit aucune augmentation de la longévité. C'est-à-dire que la durée de vie est identique avec ou sans phase de résistance.

Sur le tardigrade *M. tardigradum*, le modèle qui convient semble être le sleeping beauty (Hengherr et al., 2008).

Figure 26 : Etats de résistance des tardigrades (Miller, 2011)



## 1.9 – Résistance des tardigrades

Les tardigrades peuvent supporter des conditions environnementales extrêmes (Kinchin, 1994). Avec les rotifères et les nématodes, ce sont les seuls métazoaires capables d'entrer en anhydrobiose et cryobiose à chaque stade de leur cycle de vie, de l'œuf à l'adulte (Bertolani et al., 2004 ; Rebecchi et al., 2007).

Les études de résistance des tardigrades ont porté sur plusieurs paramètres : les solvants organiques (Ramløv et Westh, 2001), les hautes pressions (Doyère, 1842 ; Keilin, 1959 ; Ono et al, 2012 ; Rahm, 1923 ; Ramløv et Westh, 2001 ; Seki et Toyoshima, 1998), les températures extrêmes (de  $-272^{\circ}\text{C}$  à  $+151^{\circ}\text{C}$ ) ou encore les fortes doses de radiations (Jönsson et al., 2005).

Les tardigrades peuvent survivre à une exposition de plus de 7,5 GPa de pression (Ono et al., 2012), ce qui correspond à la pression s'exerçant à une profondeur de 180 km de la surface de la terre. L'échafaudage biochimique de leur forme « tun » révèle une résistance rare. En effet, ils demeurent en vie après 12 heures d'exposition à une pression de 7.5 GPa, correspondant à 69000 atmosphères (Horikawa et al., 2009 ; Ono et al., 2008) tandis qu'il est connu que le clivage des protéines commence à apparaître à 0.3 GPa (Ono et al., 2016).

Les tardigrades peuvent également survivre aux radiations solaires et cosmiques et supportent les rayons ionisants de l'ordre du kGy et les radiations UV extrêmes à des doses de plus de 10 kJ/m<sup>2</sup> (Altiero et al. 2011 ; Horikawa et al., 2006 ; Jönsson et al., 2005 , 2008 ; May et al., 1964 ; Nilsson et al., 2010).

Ces animaux peuvent ainsi rentrer d'un voyage dans l'espace sous ses conditions extrêmes et redevenir actifs sans diminution de leur survie (Jönsson et al., 2008 ; Rebecchi et al., 2009). Une petite portion de *Milnesium tardigradum* en état d'anhydrobiose a survécu à 10 jours en orbite dans l'espace soumis à une exposition de 7577 kJ/m<sup>2</sup> de radiation UV (Jönsson et al., 2008).

Les tardigrades peuvent également survivre au vide et à la dessiccation (Guidetti et al., 2011 ; Jönsson et al., 2008 ; Rebecchi et al., 2007). Sous des conditions arides, les tardigrades peuvent perdre jusqu'à 97% de leur eau (Horikawa et al., 2006 , 2008 ; Westh et Ramløv, 1991) et passer en anhydrobiose. Un tardigrade déshydraté peut ainsi survivre plusieurs années et résister à des températures extrêmes et des pressions très élevées. Ces capacités de résistances extrêmes très variées font des tardigrades de bons modèles pour les recherches en astrobiologie (May et al., 1964).

### **1.10 – Mécanismes de résistance**

Les mécanismes mis en jeu dans la résistance des tardigrades sont encore mal connus. Néanmoins, toutes ces résistances extrêmes ont été obtenues sous forme « tun ».

Durant l'anhydrobiose, le corps du tardigrade se contracte jusqu'à perdre plus de 95% de son eau. Il a été démontré qu'en état d'anhydrobiose, plusieurs mécanismes se mettent en place. Des bio protecteurs spécifiques associés à cet état, comme la superoxide dismutase ou la glutathion peroxidase (Rizzo et al., 2010), et l'expression de gènes codants des protéines de choc thermique (Hsp) ou des protéines phosphatases (PP1/PP2A) (Kondo et al., 2015 ; Reuner et al., 2010 ; Schokraie et al., 2010 ; Yamaguchi et al., 2012) peuvent protéger des dommages à l'ADN en combinaison avec des mécanismes de réparation de l'ADN très efficaces (Horikawa et al., 2013 ; Jönsson et Schill, 2007). Il a été également montré que certains tardigrades utilisent un sucre non réducteur, le tréhalose, comme protecteur de leurs structures biochimiques durant l'anhydrobiose (Crowe, 1975 ; Guidetti et al, 2011 ; Hengherr et al., 2008 ; Rebecchi et al, 2009). Toutefois, tandis que l'accumulation de tréhalose a été impliquée dans la résistance chez *C. elegans* à une dessiccation extrême (de plus de 98%) (Erkut et al., 2011 , 2013), son accumulation a pu être détectée dans certaines espèces de tardigrades mais pas chez d'autres où ce n'est apparemment pas essentiel (Hengherr et al., 2008).

Dans le cadre de la résistance au stress thermique, une étude a montré que les molécules chaperonnes (Hsp10, Hsp60, Hsp70, Hsp90, sHsp17.2 et sHsp19.5)

semblent jouer un rôle chez le tardigrade *Milnesium tardigradum* (Reuner et al., 2010).

Une étude transcriptomique a été menée sur cette même espèce ainsi que sur *H. dujardini* afin de déterminer les protéines et les voies moléculaires impliquées dans leur adaptation au stress (Forster et al., 2012). Elle a révélé que de très nombreuses voies sont impliquées : glycogène, glycolipides, réponse au stress (Hsp, bmh2, Sck1).

Dans le cas précis de notre modèle, *H. dujardini*, même si l'ensemble des mécanismes mis en jeu n'est pas connu, il a été montré que cette espèce présente un fort potentiel de résistance.

Ainsi, *H. dujardini* peut survivre à la dessiccation (Wright, 1989, 2001). Seules quelques voies ont été explorées. L'activité des sérine/thréonine phosphatases de type 1 (PP1) et de type 2A (PP2A) par exemple semble jouer un rôle dans le mécanisme d'anhydrobiose (Kondo et al., 2015).

De plus, une étude réalisée en 2015 par Beltran-Pardo et al. a montré qu'*H. dujardini* est également capable de résister aux radiations gamma. La  $DL_{50/48h}$  des individus adultes est de 4200 Gy. L'observation des effets d'une exposition aux radiations aux différents stades de développement a mis en avant une meilleure tolérance des adultes. Celle-ci semble être due en partie à leur faible activité mitotique. En effet, la division cellulaire est connue pour être sensible aux radiations.

### **1.11 – Maintenance et conditions de culture d'*Hypsibius dujardini***

La souche de référence d'*H. dujardini* a été découverte et isolée par Robert Mc Nuff (Sciento) le 13 novembre 1987 dans un étang à Darcy Lever, Bolton, Lancashire.

*H. dujardini* peut être maintenu en culture au laboratoire dans de l'eau avec des algues comme source de nourriture (Ammermann, 1967 ; Gabriel et al., 2007).

Pour nos études au laboratoire, les individus ont été maintenus sur boîtes de pétri avec coussin d'agarose ou en erlenmeyer dans du milieu Chalkley avec des algues *Chlorococcum spp.* La culture en boîte de pétri a été privilégiée afin de faciliter l'observation et la manipulation des tardigrades. Les algues *Chlorococcum spp.* ont, elles aussi, été cultivées au laboratoire dans un milieu Bold Basal. La composition des milieux Chalkley et Bold Basal est présentée en annexe B.

## **2. Métabolisme**

### **2.1 – Métabolisme des tardigrades**

Conformément à l'hypothèse qu'un métabolisme est impossible sans eau (Clegg, 1973 ; Wright et al, 1992), l'état d'anhydrobiose des tardigrades est censé être dépourvu d'activité biochimique. Cet arrêt biochimique doit permettre d'augmenter la durée de vie des tardigrades en diminuant la senescence liée au métabolisme. Un article récent a montré le réveil d'un tardigrade en antarctique après 30 ans de congélation (Tsujimoto et al., 2016).

Cependant, cette augmentation de longévité est-elle infinie ?

L'accumulation des attaques sur la matière vivante par le processus d'oxydation a été proposée pour expliquer la limite d'espérance de vie des tardigrades sous forme de « tun ». En effet, ces processus peuvent dégrader ou détruire les cellules et les structures moléculaires dont l'ADN. Durant l'anhydrobiose, sans activité métabolique, les mécanismes de réparation sont absents (Hengherr et al., 2008).

La source principale de radicaux libres pour les organismes vivants est la mitochondrie qui est l'organelle spécifique en charge du fonctionnement cellulaire mais aussi connu pour générer des radicaux libres.

De récentes études ont tenté de découvrir l'adaptation de la mitochondrie et sa contribution à la longévité des tardigrades en anhydrobiose (Tanaka et al., 2015). Elles ont permis d'identifier deux nouvelles protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) spécifiques de la mitochondrie : RvLEAM et MAHS. Celles-ci semblent avoir un rôle de protection des mitochondries lorsque les tardigrades sont placés dans des milieux pauvres en eau.

Le fonctionnement des mitochondries en entrée, en cours et en sortie d'anhydrobiose n'a encore, à ce jour, jamais été testé expérimentalement.

### **2.2 – Mesure du métabolisme / Seahorse XFe24 Analyser**

#### **2.2.1 – Mesures du métabolisme sur les tardigrades**

Jusqu'à présent, seules deux études portant sur la mesure de la consommation en oxygène des tardigrades ont été réalisées.

La première est le travail de Pigon et Weglarska en 1955. Mais elle concerne uniquement l'anabiose et deux espèces : *Macrobotus hufelandi*, capable de survivre au manque d'eau et *Macrobotus dispar*, capable de s'enkyster. Leur consommation en oxygène a été mesurée à 20°C par un micro gazomètre mis au point par l'université de Carlsberg à Copenhague. Les résultats montrent une différence significative entre anabiose vraie et sous l'état de kyste. Dans ce cas, la consommation en O<sub>2</sub> est nettement inférieure. De plus, cette même étude a montré

que chez *Macrobiotus hufelandi*, des différences en consommation d'O<sub>2</sub> sont également retrouvées en fonction du pourcentage d'humidité dans l'air. Une augmentation logarithmique est obtenue avec un accroissement d'humidité.

La seconde étude est le travail de Klekowski et Opalinski en 1989 portant sur la consommation en oxygène des tardigrades de Splitsbergen, une île norvégienne. Les mesures, réalisées sur 7 espèces de tardigrades à différentes températures, ont été effectuées à l'aide d'un ludion. Elles montrent que pour certaines espèces la consommation en oxygène est modifiée avec la température tandis que pour d'autres elle est stable à 2°C, 6°C et 10°C.

### 2.2.2 – Le Seahorse XFe24 Analyser

Depuis, un nouvel outil a été mis au point. Il s'agit du *Seahorse XFe24 Analyzer*. Le principe de la mesure de consommation en oxygène avec cet appareil a été décrit précédemment dans la partie sur les nématodes : « Etude sur la respiration - Seahorse ».

### 2.3 Observation des mitochondries / Mitotracker

Afin d'observer et de visualiser les mitochondries, différents marqueurs ou colorants existent.

- Le mitotracker Red CMXRos (figure 27) est un colorant rouge fluorescent qui colore les mitochondries dans les cellules vivantes. C'est un mitotracker dérivé de la Rosamine. Son accumulation dépend du potentiel membranaire. Son spectre de fluorescence est présenté figure 28.

Figure 27 : Formule chimique Mitotracker Red CMXRos

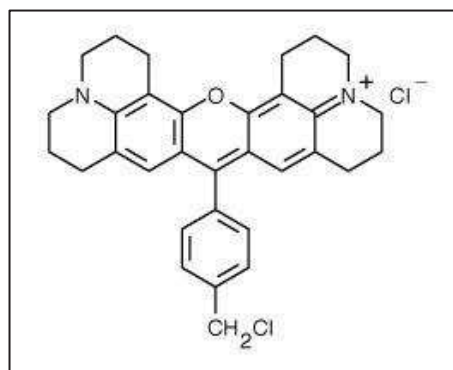
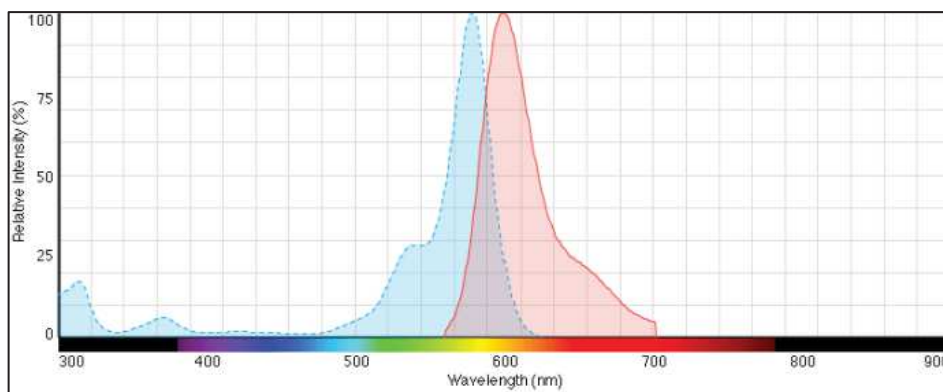


Figure 28 : Spectre de fluorescence Mitotracker Red CMXRos



- Le mitotracker Green FM (figure 29) est un colorant vert fluorescent qui apparaît pour indiquer la présence de mitochondries, quel que soit le potentiel membranaire. C'est un mitotracker dérivé de la Carbocyanine. Il colore les cellules vivantes. Son spectre de fluorescence est présenté figure 30.

Figure 29 : Formule chimique Mitotracker Green FM

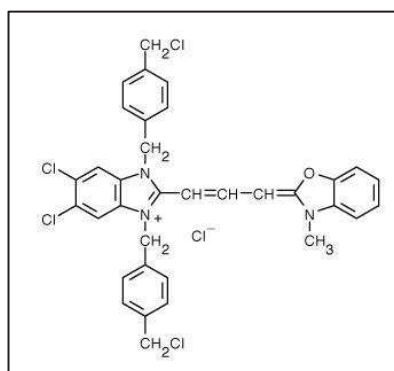
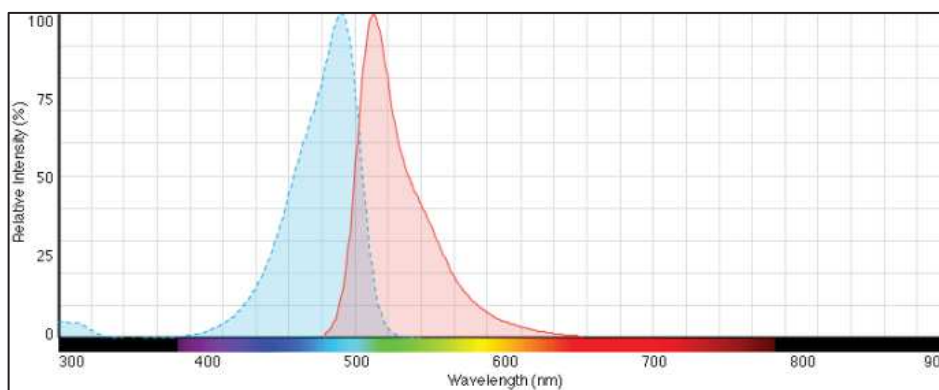


Figure 30 : Spectre de fluorescence Mitotracker Green FM



Ces deux mitotrackers Red CMXRos et Green FM sont des colorants perméables membranaires. Pour marquer les mitochondries, les cellules sont simplement incubées avec ces marqueurs qui vont diffuser passivement à travers la membrane plasmique et s'accumuler dans les mitochondries.

- Le diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2', 7' (H2DCFDA) (figure 31), perméable aux cellules, est une forme chimiquement réduite de fluorescéine utilisée comme indicateur d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Sa conversion en 2', 7' – dichlorofluorescéine (DCF) hautement fluorescente par les ROS est obtenue par un mécanisme oxydatif indirect. Son spectre de fluorescence est présenté figure 32.

Figure 31 : Formule chimique H2DCFDA

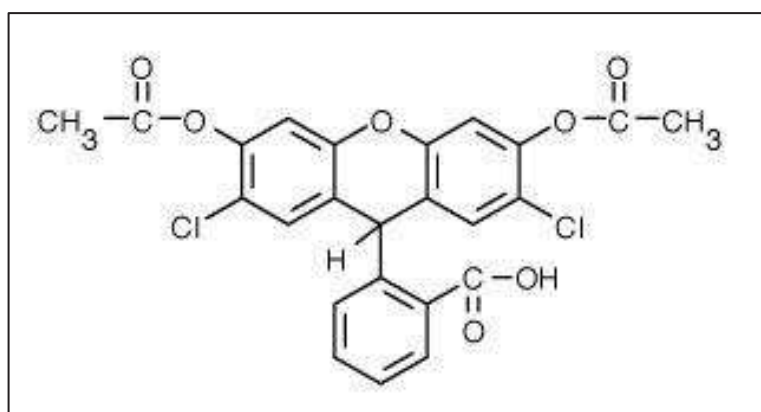
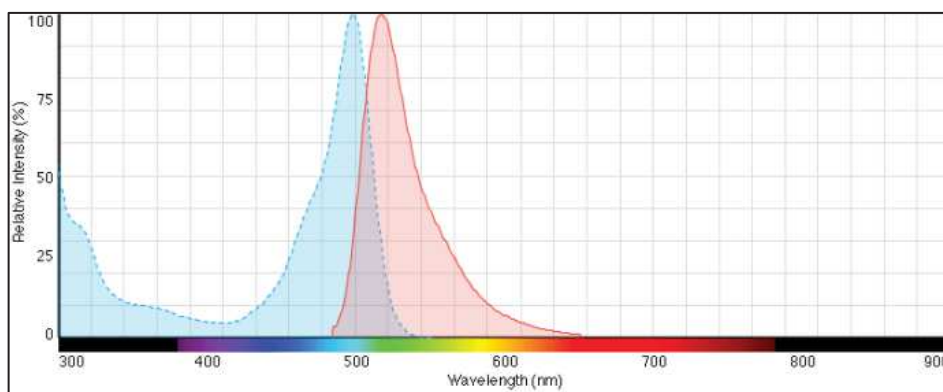




Figure 32 : Spectre de fluorescence H2DCFDA



## ***II – MATERIELS ET METHODES & RESULTATS***



## **Publication**

### **Mitochondria dynamics and anhydrobiosis of the Tardigrade**

#### ***Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840).**

Myriam Richaud<sup>a</sup>, Aurélien Perrin<sup>b</sup>, Aymeric Bailly<sup>b</sup>, Pierre Cuq<sup>a</sup> and Simon Galas<sup>a#</sup>.

<sup>a</sup> IBMM UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM. Laboratoire de toxicologie, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

<sup>b</sup> CNRS UMR 5237, Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire, France; Montpellier University, France.

<sup>#</sup> Corresponding author. Email: [simon.galas@umontpellier.fr](mailto:simon.galas@umontpellier.fr)

Article soumis dans **PLoS One**  
Numéro de manuscrit : PONE-D-16-39523

Comme nous venons de le voir, la mitochondrie est l'organelle clé du métabolisme. Des études ont essayé de déterminer la consommation en oxygène des tardigrades (Pigon et Weglarska, 1955; Klekowski et Opalinski, 1989) mais jamais chez l'espèce *H. dujardini*, ni en entrée ou sortie d'anhydrobiose. Ainsi, la dynamique mitochondriale dans les phases de transition n'a, à ce jour, jamais été testée expérimentalement.

Dans cette publication, nous montrons une analyse de la dynamique mitochondriale durant la sortie d'anhydrobiose du tardigrade *H. dujardini*. Cette étude comporte deux approches : une mesure de la respiration à l'aide du *Seahorse XFe24 Analyser* et une analyse des mitochondries en microscopie à l'aide de marqueurs mitochondriaux.

Nous avons découvert que les tardigrades commencent à bouger avant même la récupération complète de leur respiration. Nous avons également montré que, lors de la sortie d'anhydrobiose, les mitochondries se réveillent à différents moments en fonction du type cellulaire. De plus, nous avons montré que la reprise de la respiration en sortie d'anhydrobiose se fait selon une cinétique en deux étapes, révélant une transition énergétique critique durant la progression des tardigrades vers leur état normal, hydraté.

**Full title: Mitochondria dynamics and anhydrobiosis exit of the Tardigrade *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840).**

**Short title: Mitochondria and anhydrobiosis of the Tardigrade *Hypsibius dujardini*.**

Myriam Richaud<sup>a</sup>, Aurélien Perrin<sup>b</sup>, Aymeric Bailly<sup>b</sup>, Pierre Cuq<sup>a</sup> and Simon Galas<sup>a#</sup>.

a-IBMM UMR 5247 CNRS-Université Montpellier-ENSCM. Laboratoire de toxicologie, Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

b- CNRS UMR 5237, Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier, France; Montpellier University, France.

Keywords: Tardigrade; *Hypsibius dujardini*; mitochondria, respiration, anhydrobiosis.

#Corresponding author. Email: [simon.galas@umontpellier.fr](mailto:simon.galas@umontpellier.fr)

### **Abstract.**

Tardigrades can cope with harshest environmental conditions and turn to anhydrobiotic latent state life that forms by dehydration. In this paper, we analyzed the oxygen consumption rate of anhydrobiotic and living tardigrade *Hypsibius dujardini* as a mark for mitochondria function. We found that oxygen consumption during anhydrobiotic exit occurs by a unexpected two-step process. We also analyzed *in situ* mitochondria in both living and anhydrobiotic tardigrade by using mitochondria specific dyes. We were able to count the total storage cell number of animals and to record their movements inside the whole living animals. We analyzed the mitochondria network organization in living tardigrade and in the course of the anhydrobiotic exit. Finally, by using a free radical sensitive dye, we uncovered a oxidative stress that occurs during anhydrobiotic exit. We also found that tardigrade mitochondria function differs depending on the tissue location. On the basis of our results, we suggest that tissue rehydration during anhydrobiotic exit proceeds by sequential mechanisms.

## 1-Introduction

The tardigrade *Hypsibius dujardini*, also named “water bear”, belong to the superclade of Ecdysozoa which also include the Arthropoda and the Nematode phyla. These last phyla comprises two renowned invertebrates model systems for laboratories such the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the tiny worm *Caenorhabditis elegans* for Arthropods and Nematoda respectively. Tardigrades, meaning slack moving in latin, were named by Spallanzani in 1776 but were first discovered in 1773 by the pastor Johann A.E. Goeze [1], a German zoologist from which ‘kleiner Wasserbär” or “water bear” denomination originates.

Tardigrades species hold their own phylum that stands in between the phylum Arthropoda and Nematoda. About 1000 species of tardigrade have been identified so far [2-4] in a listing that comprises species from Cretaceous amber. Moreover, their earlier presence in Siberian ‘Orsten’-type phosphatised fossils from Cambrian age has been reported [5, 6].

Tardigrades are minute metazoan animals from approx. 0.1-1.2 mm in size that inhabit diverse habitats such freshwater, marine or water films of terrestrial moss and lichens. They can cope with harshest environments [7]. As for example, tardigrades have survived up to 10 kJ/m<sup>2</sup> UV exposure [8] or during a ten days space flight exposure to solar radiations at low earth orbit in the space vacuum [9]. They also survived to an exposure up to 7.5 GPa pressure [10] corresponding to the one prevailing at a depth of up to 180 km from the surface of the earth [middle of the upper mantle). Tardigrades can resist to harsh treatments such exposure to organic solvents [11], extreme temperatures (ranging from -272 to 151°C) or high radiation doses (kGy) intensities as well [12].

Nevertheless, all of these extreme resistance reports have been done on a state called tun [13, 14] that forms by dehydration of the tardigrade also believed as anhydrobiosis. Anhydrobiosis is a latent state of life induced by dehydration [15] that allows withstanding desiccation.

In the course of anhydrobiosis, tardigrade body contracts and can loose up to 95% of free and bound water resulting in a characteristic tun shape formation. Surprisingly, electron microscopic observation of the anhydrobiotic tardigrade *Macrobius hufelandi* revealed no changes in ultra-structural organisation of either cells or cell organelles [16] meaning that basic morphology do not differs between active and tun state.

It has been suggested that anydrobiotic state and accompanying specific bioprotectants [17, 18] genes expression [19-22] can protect from DNA damage upon UV radiation in combination with highly efficient DNA damage repair mechanisms [23, 24].

Additionally, some tardigrade species can use a non-reducing sugar such trehalose as a protectant of their biochemical structures [25-27]. However, while trehalose accumulation has been involved in the survival of *Caenorhabditis elegans* when extreme (up to 98%) desiccation [28], its accumulation upon desiccation can be detected in some tardigrade species but not in others where it is not known to be essential [25]. Moreover, increased polyunsaturated fatty acid content has been reported in the dehydrated tardigrade *Paramacrobius richtersi* [17].

Furthermore, biochemical scaffolds of a tun shaped tardigrade can show up uncommon resistance when coaxed to life after 12h exposure to high pressure such 7.5 GPa that roughly corresponds to 69000 atm [29] while it is generally admitted that protein folding starts to fade out at 0.3 GPa, a pressure at which bacteria and others have passed away [30].

Accordingly to previous statements that metabolism cannot be possible without water [31, 32], tardigrade anhydrobiosis state is supposed to be devoid of any biochemical activity [33]. Such biochemical shut-off has been postulated to sustain long-term lifespan expectancy of tardigrade by restraining metabolic dependent senescence. Moreover, a recent report stated the recovery of an Antarctic tardigrade after 30 years of freezing [34].

Oxidation process can target tardigrades which have adapted to harsh conditions by turning to an anhydrobiosis state. A peculiar state that acts perhaps by lessening the chemical attacks to their DNA and promotes extreme longevities.

Exogenous chemical attacks accumulation of living matter by oxidative process has been proposed to limit the life span expectancy of tun shaped tardigrades because no metabolism can be accounted for endogenous oxidant or free radicals production [25]. The main free radical endogenous source for living organisms is alleged to lie in the mitochondria which are a specific organelle in charge for cell fuel supply thereby acting as a potent free radicals generators.

Recent reports have attempted to decipher mitochondria adaptation and contribution to anhydrobiotic tardigrade longevity by identifying specific anhydrobiotic inducible proteins [35]. As for example, both microarray and proteomic analysis of another anhydrobiotic induced model organism *Caenorhabditis elegans* have highlighted the mobilisation of a protein group interestingly not involved in housekeeping functions [28].

Early works have attempted to decipher the level of oxygen consumption in tardigrades [33, 36] but neither for *Hypsibius dujardini* tardigrade specie nor during the anhydrobiotic state. Hence, mitochondria dynamics evolution in the course of either anhydrobiosis entry or transition from to living stage has not been, to date, tested

experimentally.

Here we show an analysis of mitochondria dynamics during anhydrobiosis exit of the tardigrade *Hypsibius dujardini*. We uncovered that tardigrade motion activity occurs earlier than respiration recovery completion. We also present evidence that, upon anhydrobiosis exit, tardigrade mitochondria wake up at different time depending on the cell type. In addition, we show here that *Hypsibius dujardini* respiration recovery during anhydrobiosis exit uncover a two components kinetics then arguing for a critic energetic transition episode during progression towards the living stage.

## 2- Results.

### 2-1 Oxygen consumption rate during anhydrobiotic exit exhibits a non-linear increase.

The *in vivo* oxygen consumption rate, a physiological parameter directly related to the mitochondria function and metabolism, has not yet been tested experimentally for tardigrade.

To do so, we first quantified the mitochondria function by oxygen basal consumption rate determination of living tardigrade. As shown in [figure 1](#), we observed a basal oxygen consumption rate (OCR) of up to 1.39 pmol O<sub>2</sub>/min (SD = 0.09) per tardigrade. Moreover, we also noticed that the OCR value remain stable during the 300 minutes time-course measurement with a mean value of 1.17 pmol O<sub>2</sub>/min (SD = 0.09) per tardigrade. An observation strengthened by the oxygen tension measurements during time course experiments ([S1 figure](#)). Thus, such quantification argue for the no stressful experimental condition used on living tardigrade that have been therefore confirmed by direct observations by microscopic observation at the end of each experiments.

The energetic status of tun shaped tardigrades is considered to be null because organisms on anhydrobiotic stage are accepted to be devoid of any biochemical activity. However, to date, no experimental assessments have been done to verify this assertion.

Because mitochondria are believed as the main energetic cell supply whose activity, as described above, can be tracked on the basis of oxygen consumption measurement, we then assessed if tardigrade in anhydrobiotic stage may produce, as a same, a detectable signature of energetic activity on the basis of the oxygen consumption by OCR measurement. As shown in [figure 2](#), the OCR value during the first hour of the anhydrobiotic exit time course reached a value of 0.52 pmol O<sub>2</sub>/min (SD = 0.03) per tardigrade then culminates finally to 1.25 pmol

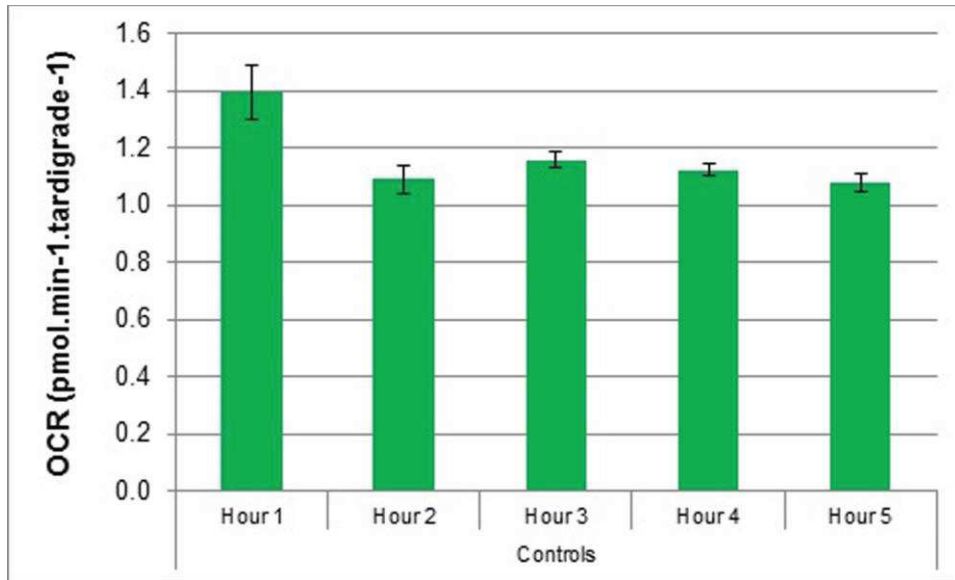


$O_2$ /min (SD = 0.24) per tardigrade four hours later. This observation indicates that tardigrade can reach almost half level of respiration value than control animals during the first hour of the anhydrobiotic exit process. Furthermore, tardigrade needs four more hours to reach an OCR that roughly equals control (1.17 pmol  $O_2$ /min per tardigrade, SD = 0.03). Thus we revealed here a two-step scheme of tardigrade energetic reactivation during anhydrobiotic exit course as follows. A first step characterized by a initial mitochondria activation and OCR detection during the first hour, which remains roughly half than control living tardigrade, then followed by a second step characterized by a slower but continuous rise in mitochondria function that culminates to an equivalent value than controls after additional four hours. On the basis of this observation, we then tried to detect earliest tardigrade oxygen consumption during anhydrobiotic exit. Nevertheless, the technical limitation of the Seahorse device used not allowed us to retrieve early OCR measure immediately after the medium addition, which acts as an initiator of the anhydrobiosis exit. As shown in [figure 3](#), we were able to detect a mean OCR value of almost 0.5 pmol  $O_2$ /min per tardigrade (0.48 pmol  $O_2$ /min, SD = 0.01) as earlier at 30 minutes after the initiation of the anhydrobiotic exit. Furthermore, we decided to explore more accurately the first hour of the anhydrobiotic exit. As shown in the [figure 4](#), we then detected a first rise in the OCR value of roughly 0.5 pmol  $O_2$ /min per tardigrade (0.47 pmol  $O_2$ /min, SD = 0.04) at 6 minutes. This OCR value tends to stagnate during the whole first 60 minutes of anhydrobiotic exit then progressively rise to reach an equivalent value than control as shown in [figure 2](#) (1.17 pmol  $O_2$ /min, SD = 0.9). These additional descriptions confirms our previous observation and define the kinetics of tardigrade anhydrobiotic exit which starts with a early and fast wake up characterized by a nearly half value than the final OCR observed five hours after anhydrobiosis exit and for controls animals. It is possible that this two-step scheme of energetic re-activation allows anhydrobiotic tardigrade to resume a new round of anhydrobiotic tun state entry in the course of rehydration process if harsh condition prematurely occurs.

Thus, by recording the oxygen respiration of up to 400 tardigrades, we uncovered that anhydrobiosis exit proceeds by different steps and needs five hours for completion.

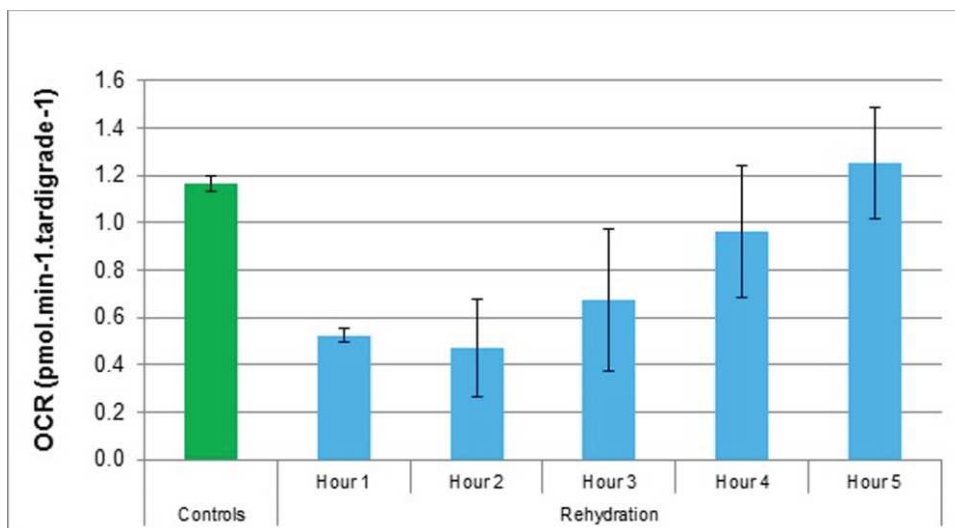
**Figure 1. Oxygen consumption of living tardigrades.**

Tardigrades were submitted for oxygen consumption measurements on Seahorse device as described in materials and methods section. The time course measure reveals stability on oxygen consumption during the whole experiments that represents measures of 200 tardigrades with a mean value calculated on the whole time course of up to 1.17 pmol O<sub>2</sub>/min (SD = 0.09) per tardigrade.



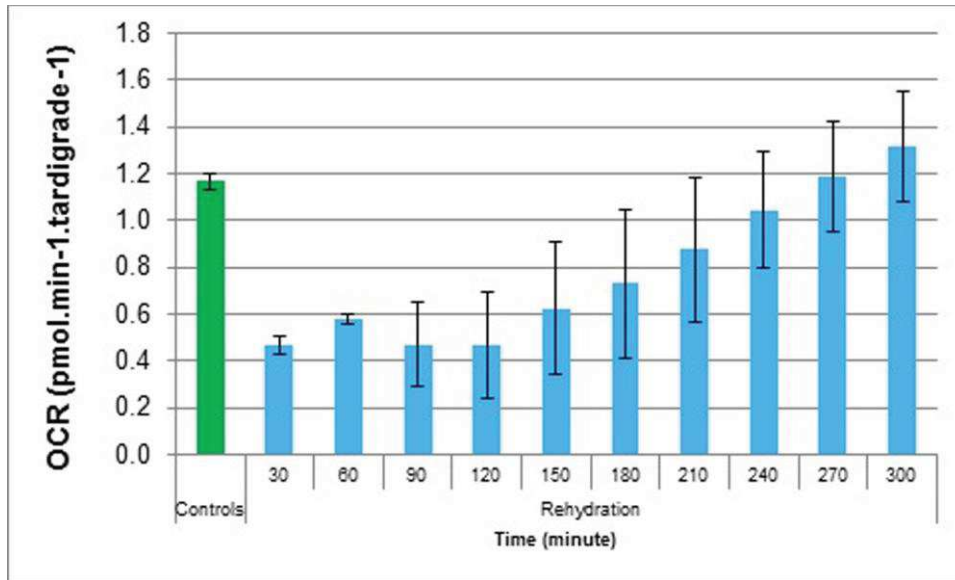
**Figure 2. Oxygen consumption of anhydrobiotic outgoing tardigrades.**

Anhydrobiotic tardigrades were submitted to rehydration on Seahorse device as specified in the materials and methods section. The oxygen consumption in the course of anhydrobiotic exit has been measured during 5 hours. Control bar represents the mean value of oxygen consumption of control living animals calculated with data of the figure 1A (1.17 pmol O<sub>2</sub>/min (SD = 0.09)). This figure represents data collection on up to 400 tardigrades.



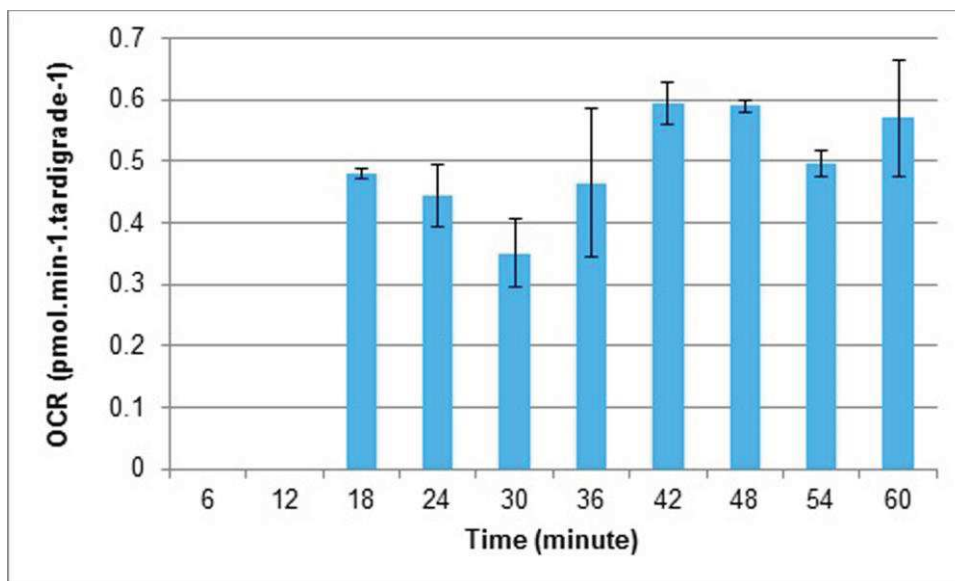
**Figure 3. Oxygen consumption rate of anhydrobiotic tardigrade by minutes time course.**

Anhydrobiotic tardigrades were submitted to rehydration on Seahorse device as specified in the materials and methods section. The oxygen consumption in the course of anhydrobiotic exit has been measured during 300 minutes. Control bar represents the mean value of oxygen consumption of control living animals calculated with data of the figure 1A (1.17 pmol O<sub>2</sub>/min (SD = 0.09)). This figure represents data collection on up to 400 tardigrades.



**Figure 4. Determination of oxygen consumption rate of anhydrobiotic tardigrade during the course of the first hour.**

Anhydrobiotic tardigrades were submitted to rehydration on Seahorse device as specified in the materials and methods section. The oxygen consumption in the course of anhydrobiotic exit has been calculated during the firsts 60 minutes. This figure represents data collection on up to 200 tardigrades.



## **2-2 The mitochondria energetic activation completion is delayed from the first motion detection in the course of the anhydrobiotic exit.**

Tardigrade motion is commonly used as end-point for tardigrade recovery process during anhydrobiotic exit. Our observation of a complete oxygen respiration recovery up to five hours after the initiation of rehydration do not obligatory correlates with a detectable tardigrade mobility. To get insights on tardigrade mobility recovery, we used time-lapse movie for motion detection. The [S1 movie](#) presents a motion picture taken at 150 minutes after the anhydrobiotic exit initiation and uncovers a tardigrade with active movements.

Thus, our observation argue for an unexpected observation by highlighting a time discrepancy between the complete tardigrade respiration recovery process, an event that needs five hours after the anhydrobiotic exit initiation to take place, and the motion activity, which begin two hours and half earlier. On the basis of the oxygen consumption measurements presented above, it is thus possible to conclude that tardigrade is able to initiate movements with only up to one half of its oxygen consumption capacity.

## **2-3 Tardigrade shows mitochondria heterogeneity.**

As described above, the *in vivo* determination of the tardigrade respiration restoration in the course of the anhydrobiotic exit can be of great help in order to understand energetic dynamics during this critical period. However such measures do not enable for highlighting *in situ* mitochondria activity in either living or anhydrobiosis outgoing tardigrade as well. Thus, we decided to uncover the structure and function of mitochondria by the use of confocal fluorescent microscopy with mitochondria specific dyes (see materials and methods section). The use of any anesthetic to keeps animals integrity allowed us to collect images of living tardigrade under confocal microscope as shown in [S2 movie](#).

The [figure 5](#), show an entire *Hypsibius dujardini* adult stained with the Mitotracker green FM dye. The staining highlighted a mitochondria pattern mainly restrained on storage cells that can be well observable at higher magnification with a well defined mitochondria network patterns as can seen on the [figure 5](#).

Storage cells or Speicher cells are storage bodies floating into the coelome which are the tardigrade body cavity [19]. The [S3 movie](#) allowed to detect mobility of storages cells inside whole animal that are well stained by the Mitotracker red CMXRos. The storage cells, whose importance in anhydrobiosis entry and exit has already been stated [7, 37], contains

storage vacuoles for lipids, peptides, carbohydrates and polysaccharides for supply to others tardigrade cell types including reproductive cells. The Mitotracker green FM dye is able to stain all of the tardigrade mitochondria without regards concerning their energetic status. To gain insights on the mitochondria structure, we decided to stain tardigrade by using the Mitotracker red CMXRos dye which mark mitochondria but, more specifically, with a high membrane potential, an energetic level that correlates with fully active state of the organelle. As shown in [figure 6A](#), the Mitotracker red CMXRos stained the storage cells as well as others structures resembling to pharynx muscles and a central part of the body where the gonad lie. The figure [figure 6B](#) show the central of the picture at higher magnification, which reveal strong staining of muscle pharynx surrounding area as well as storage cells inside the animal coelom.

It is possible that such discrepancy of the mitochondria staining between the Mitotracker green FM and Mitotracker red CMXRos dyes reflects a difference in mitochondria accessibility or merely highlights a true heterogeneity in mitochondria membrane potential between various tissues because high energetic cells, such pharynx muscles mitochondria, are found well stained by the Mitotracker red CMXRos ([figures 6C and D](#)). The [figure 6E](#) confirms this observation and highlight, as the same, the coelomic storage cells and pharynx area. Moreover, it is possible to observe on the figure 6B an expected mitochondria staining pattern because of the exclusion of the fluorescence from the cell nucleus in this area that appears as small dark dots.

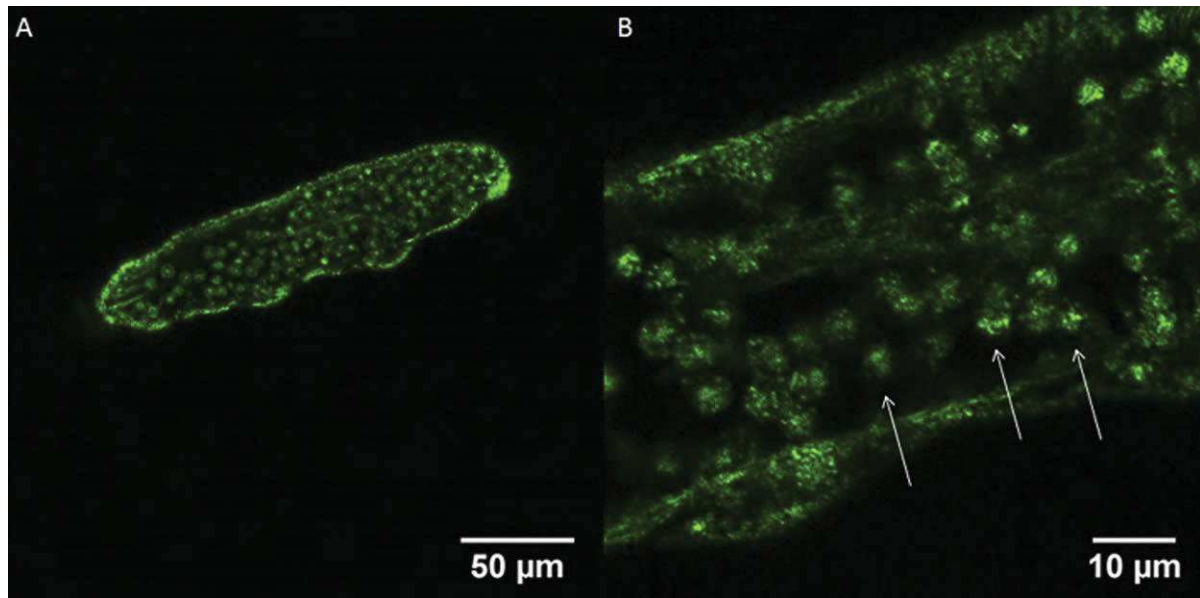
Because staining with both either Mitotracker green FM or Mitotracker red CMXRos uncovered storage cells of *Hypsibius dujardini*, we then tried to evaluate their size by direct observation of the [figures 5 and 6A](#). By the use of staining quantification, we were able to measure an apparent storage cell surface of up to  $21.7 \mu\text{M}^2$  (SD = 3.43, n = 10) for Mitotracker green FM dye and to  $24.2 \mu\text{M}^2$  (SD = 5.34, n = 10) for Mitotracker red CMXRos dye. These values are on accordance with previous report that stated for proportionality between tardigrade storage cell size and whole size of three different tardigrade species analysed [[19](#)]. In fact, the estimated storage cell size presented equals roughly half of the storage cell size of the tiniest tardigrade specie (*Macrobotus sapiens*) analysed in a previous report [[19](#)] and are consistent with the previously stated proportionality between whole non starved tardigrade size and corresponding cell storage size.

Because mitochondria staining by two different dyes shed comparable estimation of storage cell size surface, we then decided to perform a 3D analysis on four representative

stained animals with either Mitotracker green FM or Mitotracker red CMXRos (S2 figure). Such analysis allowed us to counts out up a mean of 237 storage cells (SD = 32) per tardigrade. The cell storage count retrieved by using two different mitochondria dyes are in accordance with previous report [19] that argued for the absence of correlation between tardigrade size and storage cells scoring. However, the cell storage scoring estimation obtained here for *Hypsibius dujardini* are in accordance with the order of magnitude obtained for the tiniest tardigrade described in the previous report [19].

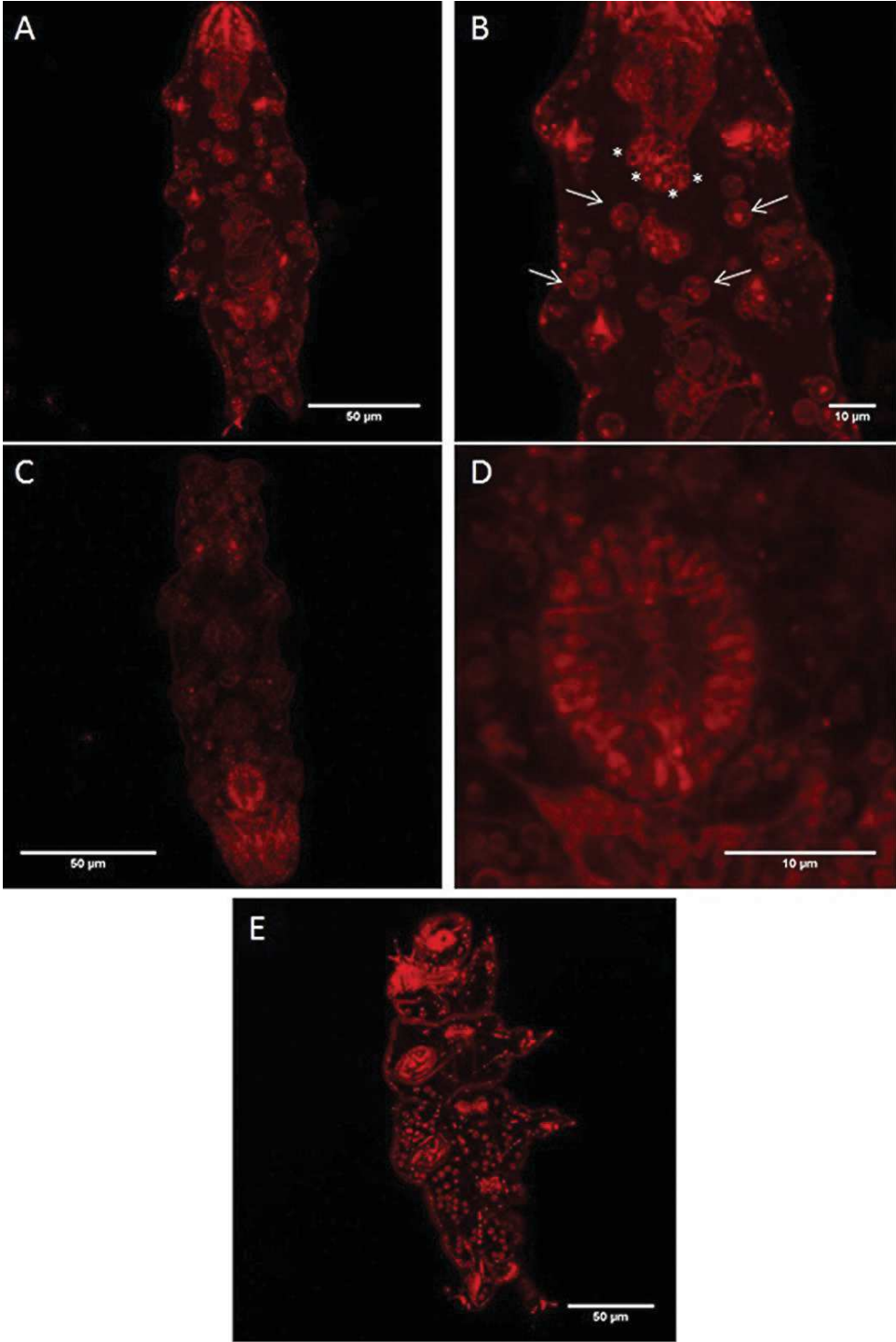
**Figure 5. Living tardigrade staining with mitochondria specific Mitotracker green FM dye reveals storage cells.**

This pictures taken on confocal microscope (as described in materials and methods) show staining of storage cells on living tardigrade at two different magnifications with the mitochondria specific Mitotracker green FM dye. The higher magnification picture shows the central part of the whole animal and reveals stained storage cells (white arrow).



**Figure 6. Living tardigrade staining with mitochondria specific Mitotracker red CMXRos dye reveals storage cells and pharynx muscles mitochondria.**

This pictures taken on confocal microscope (as described in materials and methods) show staining of mitochondria with Mitotracker red CMXRos dye and reveal, at either low magnification (A, C, E) or higher magnification (B and D), the mitochondria of muscle cells in the pharynx area (white asterisks) as well as mitochondria of coelomic storage cells (white arrows). Moreover, it is possible to detect inside the pharynx area defined by the asterisks an expected staining pattern for mitochondria because of their exclusion for cell nucleus that appeared as small dark dots inside the same area.



## **2-4 Anhydrobiotic tardigrade staining with mitochondria specific dyes failed to reveal cell structures.**

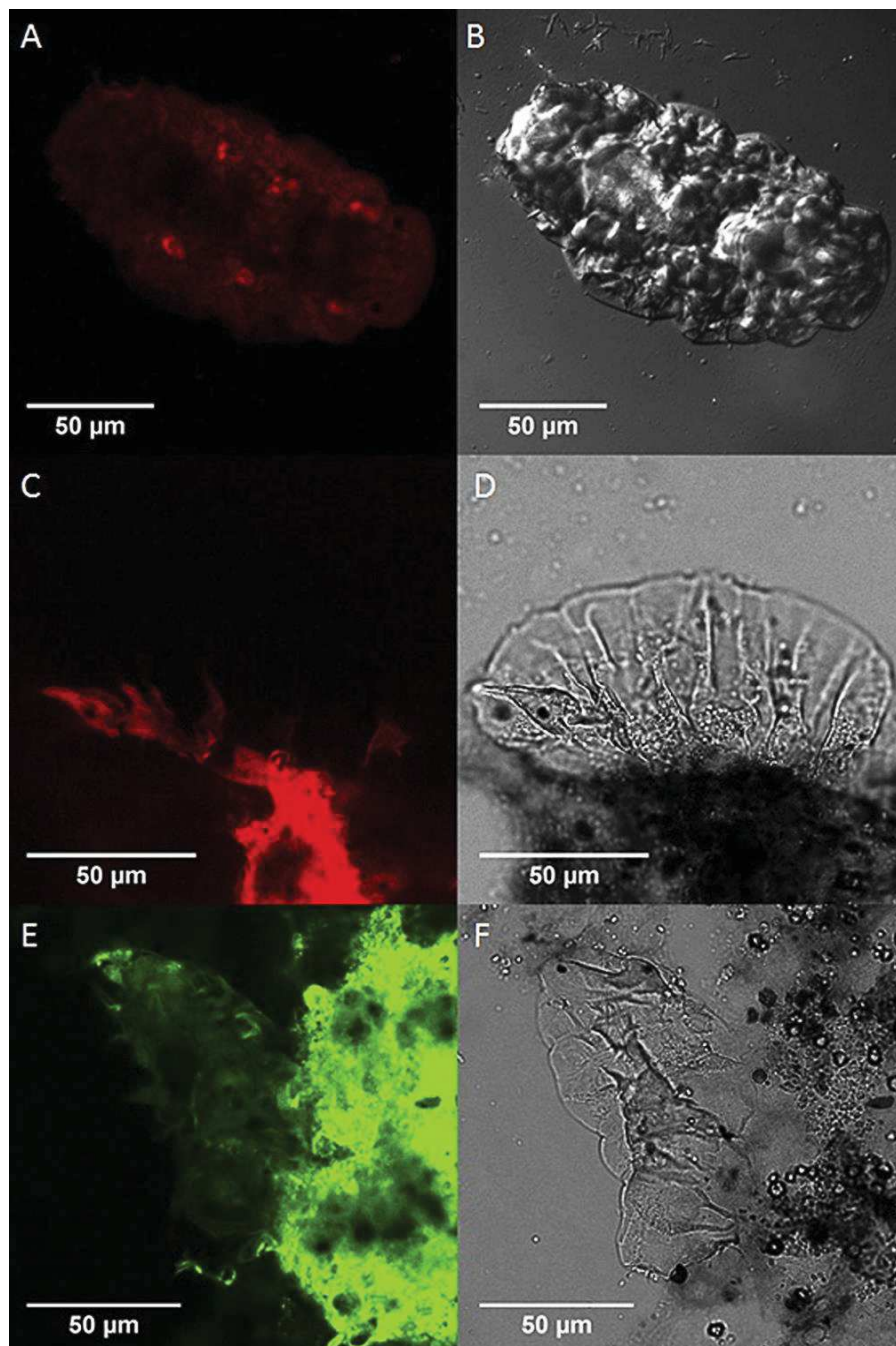
In an attempt to uncover tun tardigrade mitochondria, which are on anhydrobiosis state, we then tried to stain animals with either Mitotracker green FM or Mitotracker red CMXRos (see materials and methods). As shown in [figure 7](#), both staining with either Mitotracker red CMXRos ([figure 7A-C](#)) or Mitotracker green FM ([figure 7E](#)) appeared less defined than for living tardigrade shown above. This result cannot be explained by dyes solubility failure because staining occurred at living stage and before the anhydrobiosis induction.

It is possible that such faint staining observed with both dyes results from biochemical rearrangements during anhydrobiosis installation. An event particularly expected because of profound chemical modifications accompanying the water disappearance. Moreover, this possible explanation is strengthening by previous observation of the anhydrobiotic tardigrade *Macrobius hufelandi* [16] which revealed no modifications of ultra-structural organisation of cell organelles including mitochondria.



**Figure 7. Staining with mitochondria specific Mitotracker red CMXRos and Mitotracker green FM dye failed to highlight mitochondria associated cell structures in anhydrobiotic tardigrade.**

Dehydrated (tun) tardigrade were stained with either Mitotracker red CMXRos (A, C) or Mitotracker green FM (E) dyes then observed on confocal microscope (as described in materials and methods). The pictures B, D and F represent dehydrated animals on the tun stage as revealed by light microscopy while the pictures A, C, E shows the corresponding animals on fluorescent confocal microscopy for mitochondria dye detection.



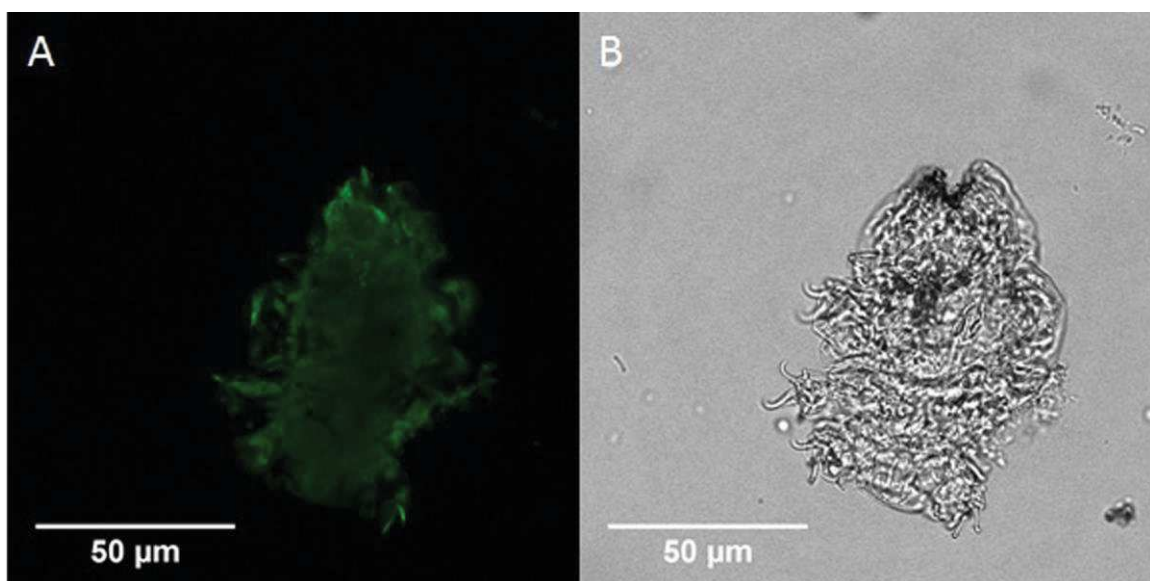
## 2-5 Tardigrade anhydrobiosis exit shows progressive cell function activation.

Because the staining of tun shaped tardigrade with either Mitotracker green FM or Mitotracker red CMXRos failed to give a clear mitochondria pattern, we then assessed, by the same, the animals in the course of anhydrobiotic exit.

As shown in the [figure 8](#) and [S4 movie](#), the Mitotracker green FM dye do not allowed us to reveal mitochondria staining which appeared instead comparable to the one of the anhydrobiotic tardigrade (see [figure 7](#)) even 1h30 after anhydrobiosis exit initiation. On the contrary, and as shown on [figure 9A and C](#), the Mitotracker red CMXRos dye allowed to highlight cell structures at roughly equivalent time of the anhydrobiosis exit (between 1h30 and 2h). The staining progressively tends to turn more accurate with visible pharynx muscles and detectable mitochondria network re-organization at higher magnification ([figure 9F](#)). It was also possible to detect on some individuals a mitochondria staining on the posterior part ([figure 9H](#)). However, we were not able to detect storage cells at this time of anhydrobiotic exit probably in virtue of their profound size modification during anhydrobiosis entry and exit as previously stated for another tardigrade specie *Richtersius coronifer* [37].

### **Figure 8. Mitotracker green FM dye staining of animals in the course of rehydration failed to highlight mitochondria at 1h30 after rehydration initiation process.**

Tardigrade were stained with Mitotracker green FM dye then observed on confocal microscope (as described in materials and methods) at 1h30 after rehydration initiation. The pictures B represent animals in the course of rehydration revealed by light microscopy while the pictures A shows the corresponding animals on fluorescent confocal microscopy for mitochondria dye detection.

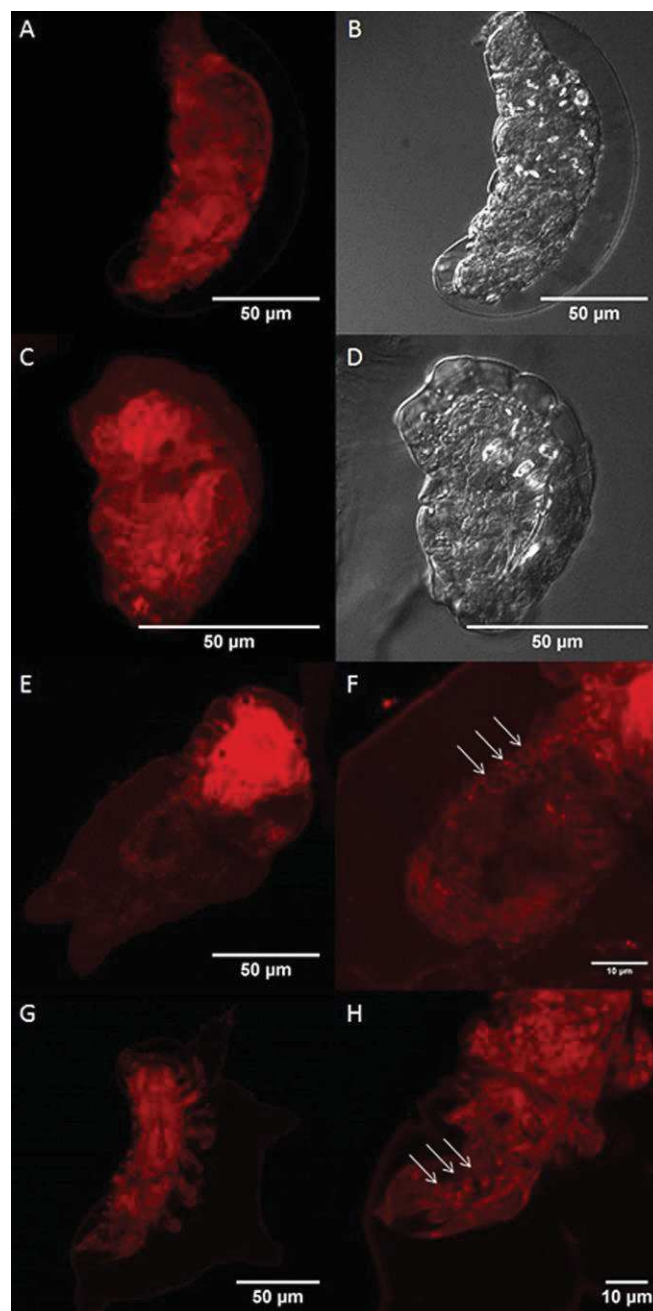


**Figure 9. Tun tardigrade staining with mitochondria specific Mitotracker red CMXRos failed to detect whole mitochondria during earlier phase of the rehydration process but highlight mitochondria reorganisation.**

Tardigrade were stained Mitotracker red CMXRos dye then observed on confocal microscope (as described in materials and methods) between 1h26 and 2h10 after rehydration initiation.

The pictures were taken respectively at 1h26 for A and B, 1h46 for C and D, 1h50 for E and F and 2h10 for G and H.

The pictures show early anhydrobiotic exit of tun tardigrade with general staining of various tissues without detectable mitochondria network (A-C). The figure F show a later mitochondria detection that starts to re-appears in specific area that can be identified as muscle pharynx cells (white arrows) which tends to organise mitochondria network surrounding black dots which are probably the cell nucleus. The white arrows on the figure H define mitochondria network re-organisation on the posterior part of another animal.



## 2-6 Reactive oxygen species fluorescent indicator uncover oxidative stress in the course of anhydrobiotic exit.

It is well admitted that, in the course of the dehydration process and tun formation, water depletion leads to reactive oxygen species increase as a consequence of ionic concentration rise [17]. In accordance with, various reactive oxygen species scavenger enzymes of the tardigrade specie *Paramacrobionus richtersi* have been shown to increase in their activity during anhydrobiotic entry [17] while other enzymes do not. The same report also stated that oxidative stress is also expected to occur during anhydrobiotic exit because of the rehydration process. Moreover, it has been recently shown [28], in the worm model *Caenorhabditis elegans*, a sixteen-fold induction of a particularly reactive oxygen species scavenger such the cytosolic superoxide dismutase *sod-5* during the desiccation of the Dauer larvae. The Dauer larvae form the resistance state of the worm *Caenorhabditis elegans*. We then decided to use the H<sub>2</sub>DCFDA, a fluorescent indicator, to stain *in vivo* reactive oxygen species production. Because of a low sensibility [38], the H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent dye is believed as inappropriate for superoxide anion radical detection but however suitable for overall detection of reactive oxygen species (see materials and methods) as previously used in the *Caenorhabditis elegans* model [39].

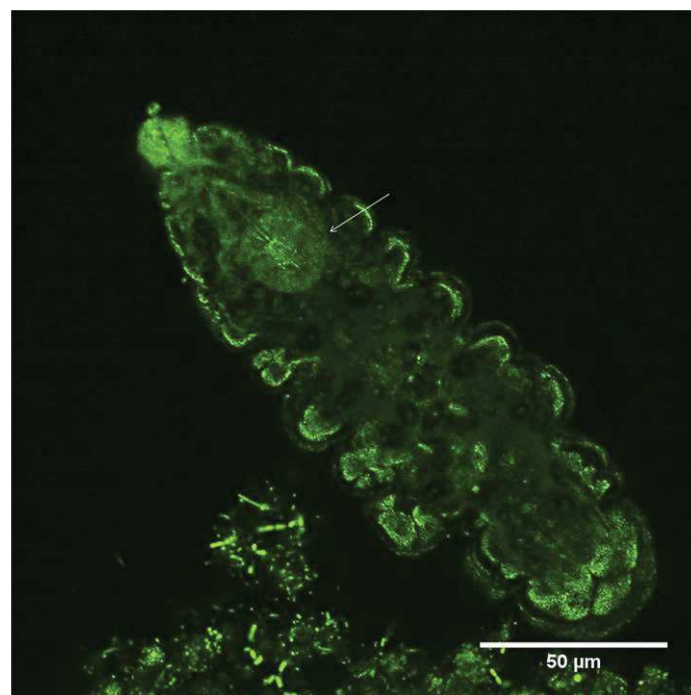
The figure 10 and S4 movie shows internal structures stained by the H<sub>2</sub>DCFDA. We can detect the pharynx on the anterior part of animals and a peripheral fluorescent pattern but not restricted to cell structure. The figure 11A show another adult tardigrade stained by the H<sub>2</sub>DCFDA and surrounded by a non-specific fluorescent background. However, as seen at higher magnification on figure 11B, we can detect the pharynx muscle cells with mitochondria network and well defined structures on the posterior part of the animal that resemble storage cells as seen on figure 11C. The H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator stained the area surrounding the pharynx on the figure 11B and defined a granular structure corresponding to mitochondria with a higher degree of free radical production.

A recent report [40] showing the *in vivo* analysis of reactive oxygen species produced by the tardigrade *Paramacrobionus richtersi* allowed the identification of the superoxide anion radical only. This report then stated that *Paramacrobionus richtersi* may produces exclusively superoxide anion radical. By using the H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator, which is sensitive to overall reactive oxygen species but not to superoxide anion radical, we show here that *Hypsibius dujardini* behaves differently from previous report of the tardigrade *Paramacrobionus richtersi*.

Because oxidative stress during either anhydrobiotic entry or exit process has been proposed in previous analysis [17], we then assessed by the use of the same fluorescent indicator, the status of dehydrated animals. As shown in [figures 12A-F](#), a faint staining appeared in whole dehydrated animals, which do not allow us to clearly define a given internal structure. We then assessed if the oxidative stress sensitive fluorescent probe used here allowed us to highlight reactive oxygen species during anhydrobiosis exit at roughly one hour after rehydration initiation. As shown in [figures 13A-C](#), we were able to detect a fluorescent signal associated with internal structures. Moreover, in some animals, the signal appeared as intense small dots, which are consistent with mitochondria reactivation location. The results with the H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator shown above allowed us to highlight muscle pharynx muscle structures in living animals. The pictures showed here [figures 13A-C](#) do not allowed to define muscle pharynx structure. This observation indicates perhaps a coelomic mitochondrial reactivation, where storages cell lie, then followed by mitochondria muscle pharynx activations as already shown for full living adults [figure 11B](#).

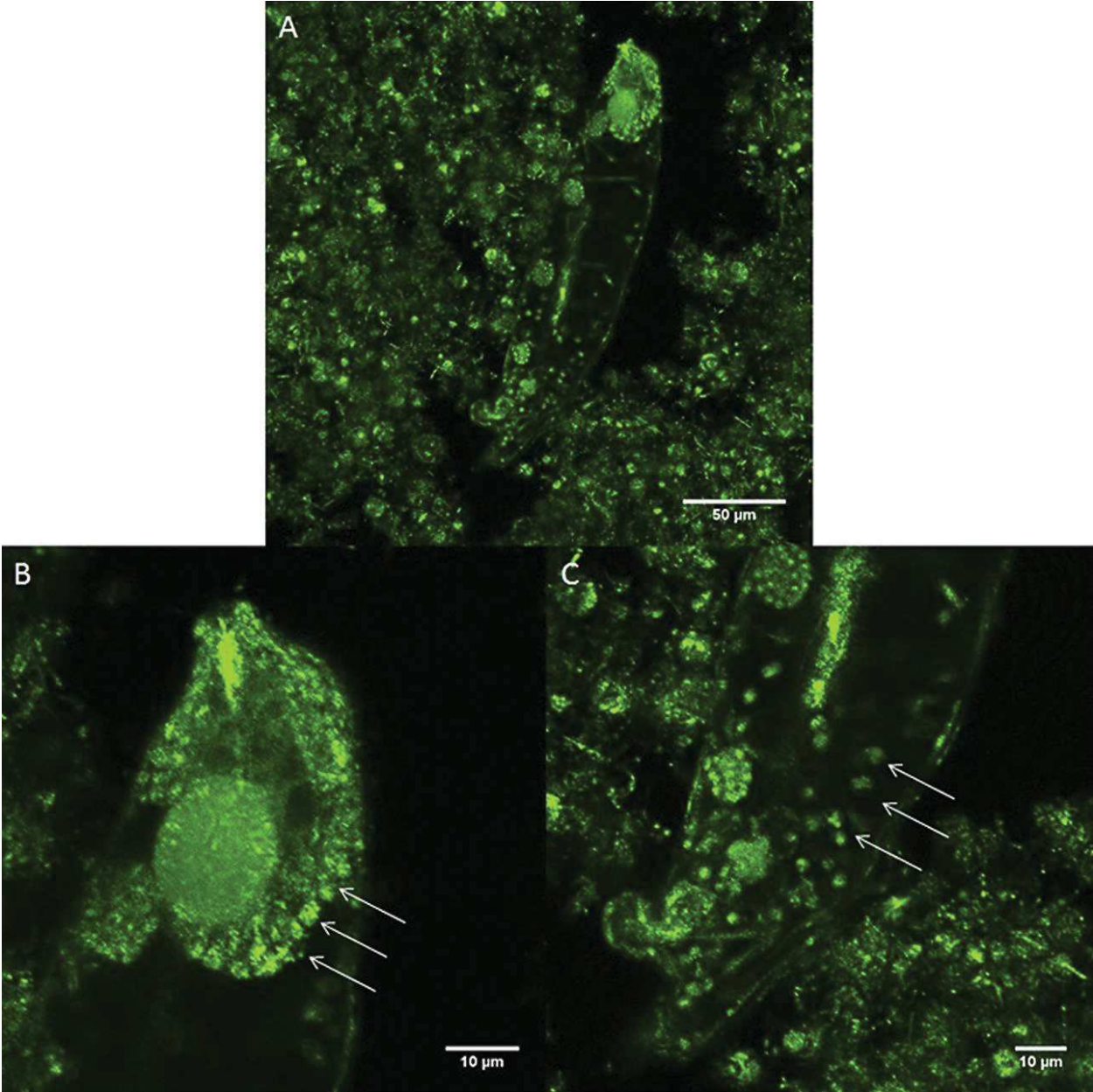
**Figure 10. The H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator highlight reactive oxygen species in control living tardigrade.**

Tardigrade were stained with H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator then observed on confocal microscope (as described in materials and methods). The picture represents tardigrade with fluorescent structures associated with muscle pharynx tissues (white arrow) and peripheral fluorescence.

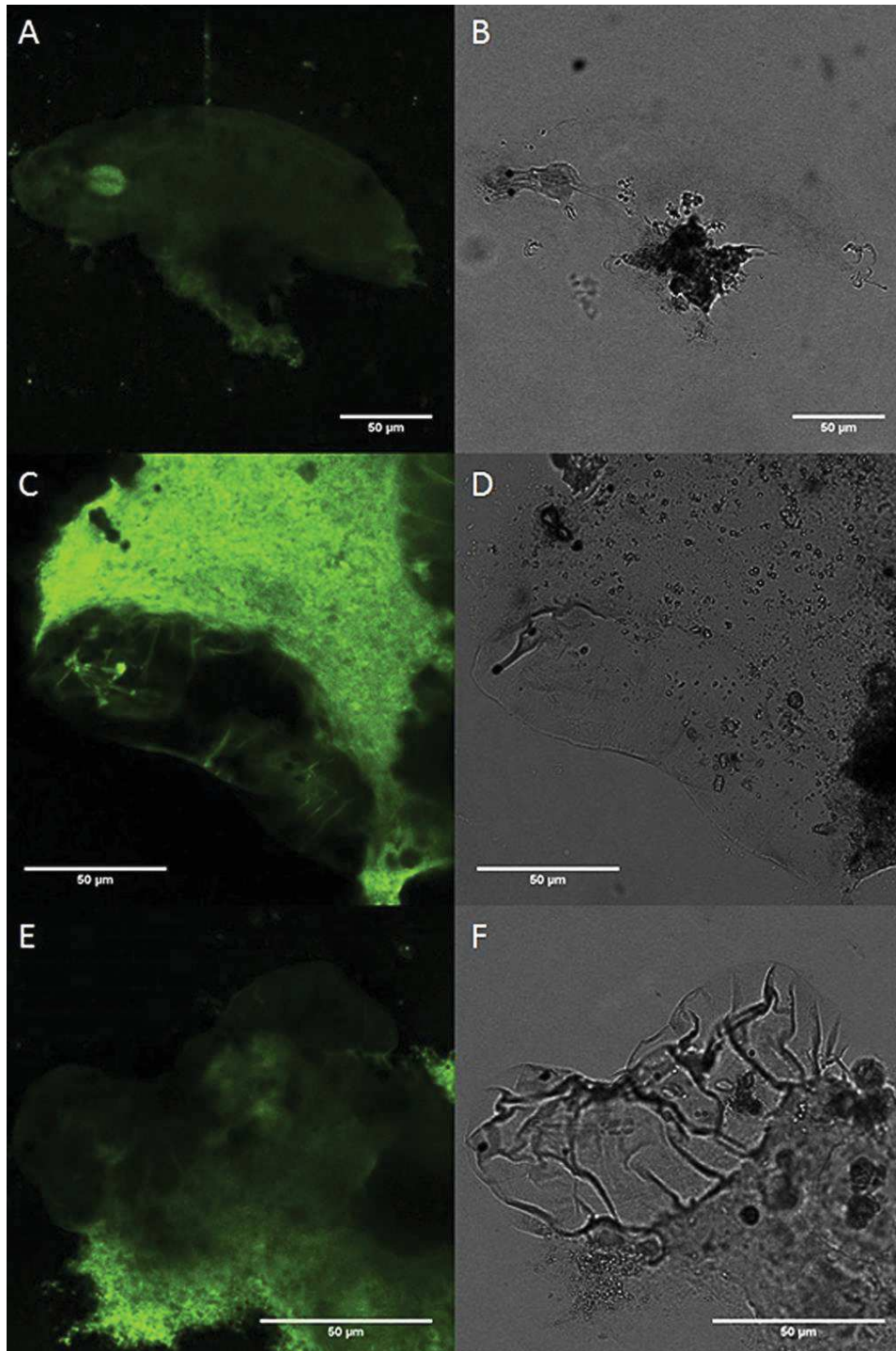


**Figure 11. The H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator of reactive oxygen species highlight mitochondria network on control living tardigrade.**

Tardigrade were stained with H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator then observed on confocal microscope (as described in materials and methods). The picture A represent a whole tardigrade with surrounding non-specific staining (mainly *Chlorococcum* algae) while higher magnification of anterior part (figure 11B) allows the identification of mitochondria associated fluorescence of pharynx muscle cells (white arrows). Higher magnification of the posterior part (figure 11C) allows identification of mitochondria associated fluorescent signal that resemble coelomic storage cells (white arrows).

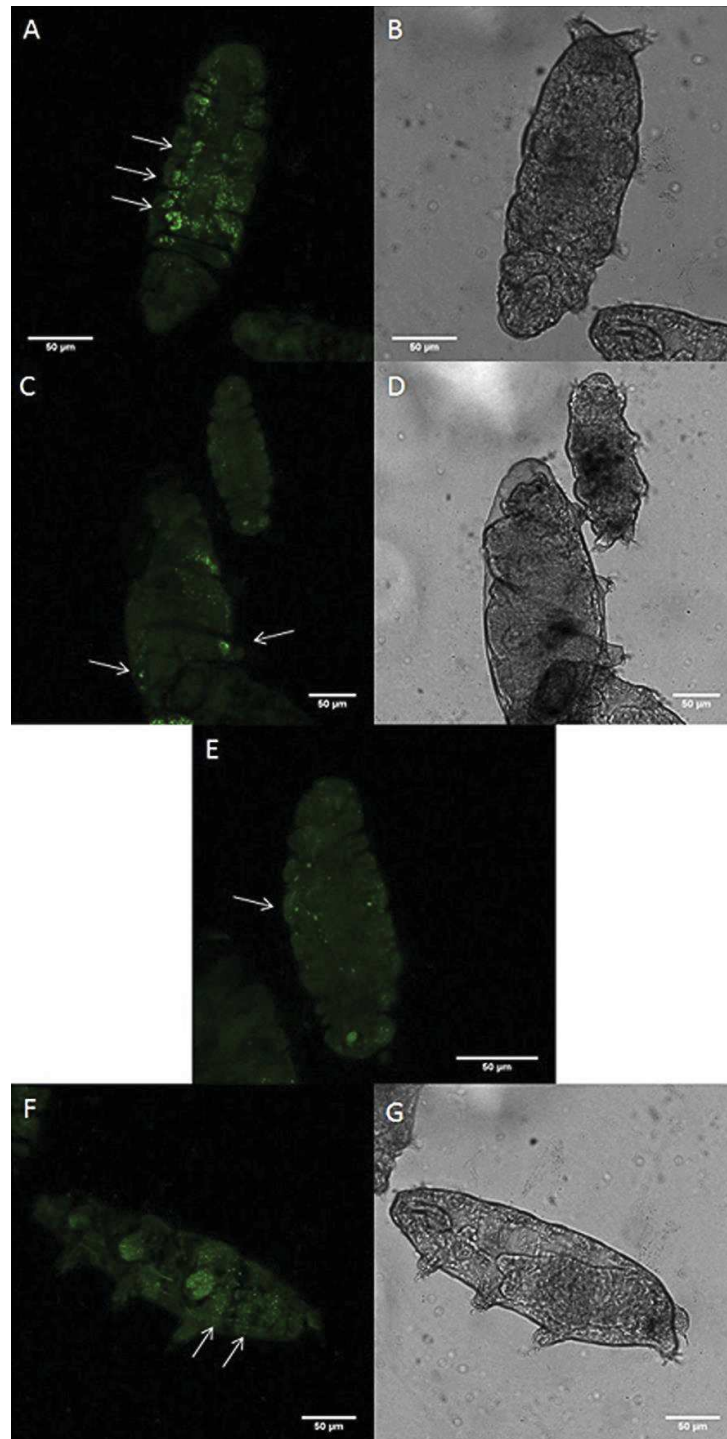


**Figure 12. The H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator failed to stain anhydrobiotic tardigrade.** Dehydrated (tun) tardigrade were stained with the H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator then observed on confocal microscope (as described in materials and methods). The pictures B, D and F represent dehydrated animals on the tun stage as revealed by light microscopy while the pictures A, C, E shows the corresponding animals on fluorescent confocal microscopy for free radical detection.



**Figure 13. The H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent allows detection of oxidative stress during anhydrobiosis exit.**

Dehydrated (tun) tardigrade were stained with the H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator then observed on confocal microscope (as described in materials and methods) at 1h30 after rehydration beginning process. The pictures B, D and G represent animals in the course of rehydration as revealed by light microscopy while the pictures A, C, E and F shows the corresponding animals on fluorescent confocal microscopy for free radical detection by the H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator. The white arrows point free radicals appearance inside animals as revealed by H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent indicator signal.





### 3- Discussion

In this report, we have assessed for the *in vivo* *Hypsibius dujardini* mitochondria function and respiration. By the use of a Seahorse device, we succeeded in measuring animals oxygen consumption rate and uncovered that anhydrobiosis outgoing animals needs 5 hours for total respiration recovery completion. Moreover, by analysing time course respiration during anhydrobiosis exit we found a two-step mechanism that possibly argue for the existence of two critical and successive phases with different kinetics. One early respiration restoration phase allowed animals to reach half oxygen consumption capacity followed by a slower phase that culminates with complete oxygen consumption restoration than living animals. Such non-linearity kinetic of respiration restoration showed by anhydrobiotic outgoing tardigrade possibly reflects, in some instance, differences in the committed mechanisms mobilized during these two critical periods.

We then tried to look for *in situ* mitochondria behaviour in animals because mitochondria represent the major source metabolic activity in living animals. To do so, we used mitochondria specific dyes that allowed us to highlight storage cell movements inside living animals as well as variations in mitochondria staining depending on the energetic level of internal tissues. The mitochondria staining obtained in this study allowed to perform a complete storage cells numeration and size distribution. Two quantitative values were retrieved and appeared in accordance with regards of previous tardigrade species analysed so far [19].

The *in vivo* mitochondria staining allowed us to reveal a possible existence of a tissue re-activation hierarchy during anhydrobiotic exit of the animals. On the basis of the internal tissue staining obtained here with both mitochondria specific dyes and free radicals fluorescent indicators, this hierarchy may involve an early reactivation of the storage cells then followed by a reactivation of internal muscle tissues such pharynx muscles.

With help of various drugs, a recent report [41] has shown the critical involvement of mitochondria energy and functional muscles on both tun formation and survival of the tardigrade *Richtersius coronifer*. However, this analysis not assessed for the possible involvement of the mitochondria of storage cells for either anhydrobiosis entry or exit.

It is possible that the existence of such difference on tissues reactivation sequence is the root cause of the peculiar two step of kinetics respiration restoration completion observed during the anhydrobiosis exit process.

Finally, by the use of a free radical sensitive fluorescent indicator, we able to uncover

that tardigrade *Hypsibius dujardini* suffered oxidative stress during anhydrobiotic exit as stated by indirect evidence in previous reports [17].

Some recent techniques [40, 42] tend to facilitate the accessibility to tiny structures as such as sub-cellular compartments of animals like tardigrade or worms as well. Such technique now allows for whole oxygen consumption and free radical production assessments while others allow performing *in situ* analyses with possible endogenous tissue discriminations.

It is of great outstanding that this combination techniques may contribute to a better understanding of what really going on when a water bear return to life after an anhydrobiotic stage.

#### **4- Materials and methods**

##### **Culture of tardigrades.**

Tardigrades *Hypsibius dujardini*, (Doyère, 1840) and unicellular algae *Chlorococcum* sp. used for food were purchased from the Sciento company (Manchester, UK). Tardigrade cultures were maintained at 15°C on Chalkley's medium as previously described by [43].

##### **4-1 *In vivo* mitochondria specific dyes staining.**

The following dyes used for mitochondria staining were purchased at Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Both Mitotracker red CMXRos (cat M7512) and Mitotracker green FM (Cat M7514) were diluted at 5 mM in DMSO while H<sub>2</sub>DCFDA (cat D399) at 10 mM in DMSO as stock solutions. All dyes stock solutions were stored at -20°C before use.

Both Mitotracker red CMXRos (a rosamine-based MitoTracker) and Mitotracker green FM (a carbocyanine-based MitoTracker) are cell permeable dyes that can diffuse across cell membranes and accumulates into mitochondria when a membrane potential occurs. Nevertheless, while Mitotracker red CMXRos can be trapped into the mitochondria after oxidization and sequestration by binding to sulphur containing amino acids [44, 45], Mitotracker green FM do not. But the main difference between the Mitotracker red CMXRos and Mitotracker green FM dyes lie on their reliance regarding the mitochondria energetic status to accumulate into mitochondria. Thus, while the Mitotracker red CMXRos behaves as a mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ )-sensitive fluorochrome, the Mitotracker

green FM do not. This means that any tardigrade mitochondria must be stained with the Mitotracker green FM while only mitochondria with a Delta psi m of sufficient level (as encountered in fully active mitochondria) will be stained by the Mitotracker red CMXRos. Then, if a failure in the Delta psi m of a mitochondria occurs, as for example during apoptosis, the Mitotracker red CMXRos stain tends to fade away [46, 47].

The H<sub>2</sub>DCFDA, a reduced form of fluorescein, is known to exert a broad sensitivity *in vivo* for reactive oxygen species such hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and peroxyxynitrite with the exception of superoxide anion radical [48, 49]. The conversion of H<sub>2</sub>DCFDA to a highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) proceeds by oxidisation mechanisms.

#### **4-2 *In vivo* oxygen consumption rate (OCR) measurements.**

The OCR measurement of tardigrade were performed on a Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyser equipment (Seahorse bioscience Inc., North Billerica, MA, USA) as previously described for *Caenorhabditis elegans* [42] but with slight modifications as follows. Briefly, tardigrades were individually picked up, in order to remove algae food source, with a 10ul Pipetman (Gilson International B.V., Aj Den Haag, The Netherlands) and disposed up to one hundred per well on at least five wells for each replicates into 500ul of Chalkley's medium-filled 24-well Seahorse plates. Preliminary experiments with M9 media, as previously reported for *Caenorhabditis elegans* [42], failed to provide interpretable measurements. Furthermore, 50 tardigrade per well generates no detectable OCR signal above the background while 500 tardigrade per wells condition yielded no OCR signal improvement than the previously 100 tardigrades per well condition assessed. Internal control measurements for each 24-well Seahorse plates were done by filling five wells with 500ul of Chalkley's medium. The S3 figure summarise the Seahorse workflow used. Tardigrades were starved 12 hours before each experiment in order to remove possible remaining algae in tardigrades gut.

The computer program of the Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyser used was: 1- calibrate probe; 2- loop 50 times; 3- mix for 2 minutes; 4- time delay 2 minutes; 5- measure 2 minutes; 6- loop end. The internal heater of the device was set at 20°C. At the end of the analysis, each 24-well Seahorse plates were retrieved and tardigrade numeration, shape and living status examined. This experiment was done on up to at least two replicates.

#### **4-3 Anhydrobiotic tun oxygen consumption rate (OCR) measurements.**

The OCR measurements during tardigrades anhydrobiotic tun– rehydration transition were done as follows. Tardigrades were individually picked up under a stereomicroscope (MZ6, Leica, Wetzlar, Germany), in order to remove algae food source, with a 10ul Pipetman (Gilson International B.V., Aj Den Haag, The Netherlands) and disposed up to one hundred per well on five wells for each replicates into 500ul of Chalkley's medium-filled 24-well Seahorse plates. Anhydrobiotic tardigrade state was conducted as described [25] by placing Seahorse plates at 25°C on a preconditioning sealed box with 85% relative humidity (RH) for 16 hours with a saturated solution of KCl then by moving them on a sealed box at 33% relative humidity (RH) for 48 hours with a MgCl<sub>2</sub> saturated solution. Tardigrade loaded Seahorse plates were kept no more than two weeks days at room temperature on a sealed box. For the OCR determination, 500ul of Chalkley's medium was added in anhydrobiotic tardigrades containing wells and immediately proceeded for time lapse OCR measurement of tardigrade anhydrobiotic tun – rehydration transition. This experiment was done on up to at least two replicates.

#### **4-4 Oxygen consumption rate (OCR) calculation.**

The individual tardigrade O<sub>2</sub> consumption per minute (pmol O<sub>2</sub>/min) determination was normalized in accordance with the Seahorse bioscience Inc. guidelines. Briefly, to prevent possible measurement variations of the Seahorse device between time-points, we selected a minimum of 50 time-points in five different wells for the calculation of a background-corrected OCR average. Both average and standard deviation of OCR per tardigrade was calculated across the five replicates for each experiment on the basis of control numeration of living tardigrade in each Seahorse plate wells at the end of the OCR measurements.

#### **4-5 *In vivo* mitochondria staining of living tardigrade.**

Individual tardigrades were picked up under a stereomicroscope (MZ6, Leica, Wetzlar, Germany) with a 10ul Pipetman (Gilson International B.V., Aj Den Haag, The Netherlands) and placed on slides covered with a drop of 1:1000 diluted mitochondria dyes in Chalkley's medium. Coverslip was fixed using nail polish then slides kept 20 minutes for incubation with

dyes before laser confocal microscopy assessments. No anaesthetics were used at any steps and living tardigrades were recorded no more than up to 60 minutes to avoid any stress induced by the confocal device.

#### **4-6 *In vivo* mitochondria staining of anhydrobiotic tun tardigrade before dehydration.**

Tardigrades were picked up individually under a stereomicroscope (MZ6, Leica, Wetzlar, Germany) then disposed on slides covered with a drop of 1:1000 diluted mitochondria dyes in Chalkley's medium. After Chalkley's medium remnants elimination, the slides were then processed for dehydration as described in the upper section "anhydrobiotic tun oxygen consumption (OCR) rate measurements". Correct and complete dehydration was assessed under a stereomicroscope (MZ6, Leica, Wetzlar, Germany). On the day of, the slides were retrieved and a thin layer of Chalkley's medium was added. A coverslip was immediately fixed using nail polish and slides processed for analysis under confocal microscope. No anaesthetics were used and tardigrades wake-up recorded no more than up to 130 minutes to avoid any stress induced by the confocal device.

#### **4-7 *In vivo* mitochondria staining of anhydrobiotic tun tardigrade in the course of rehydration.**

Tardigrades were processed as described in the upper section but without mitochondria dyes, which were added on the day of at 1:1000 dilution in Chalkley's medium just at the time of slide rehydration, then immediately processed for confocal microscopy analysis.

#### **4-8 Light microscopy and image analysis**

To image total tardigrade mitochondria we used both MitoTracker Red CMXRos and Mitotracker green FM while the H<sub>2</sub>DCFDA was used as a general oxidative stress sensor. Quantitative images of total tardigrade mitochondria were acquired with confocal microscope (SP5-SMD, Leica, Wetzlar, Germany) with either a 10X objective (10x/0.3 HCX PL FLUOTAR, Leica), 40X (40x/1.3 OIL HCX PL APO CS, Leica) or 63X (63x/1.4 OIL HCX PL APO CS, Leica) magnification. Mitochondria were stained with MitoTracker Red CMXRos and Mitotracker green FM (Invitrogen) and visualized with HeNe at 594nm and

Argon laser at 488nm. We used H2DCFDA (Ex/Em =485/515nm) probe sensitive to oxidation by reactive oxygen species to measure oxidative stress according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

## 5 – Acknowledgement

The authors wish to thank Dr. Carine Chavey from the Molecular genetics Institute of Montpellier for helpful discussion and its technical assistance for the use of the Seahorse device. We also thank the Montpellier Rio Imaging facility for helpful assistance.

## 6 – References

1. Goeze, JAE. Herrn Karl Bonnets Abhandlungen aus der Insektologie aus d.Franz. u.Ä. übers. u mit einigen Zusätzen hrsg. 1773; v. Joh. August Ephraim Goeze Gebauer, Halle, 414.
2. Guidetti R, Bertolani R. Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa*. 2005; 845: 1–46.
3. Degma P, Guidetti R. Notes to the current checklist of Tardigrada. *Zootaxa* 2007; 1579: 41–53.
4. Degma P, Bertolani R, Guidetti R.. Actual checklist of Tardigrada species. 2016 (Available from <http://www.tardigrada.modena.unimo.it/miscellanea/Actual%20checklst%20of%20Tardigrada.pdf>, pp. 41. Accessed date 3/7/2016).
5. Müller K, Walossek D, Zakharov A. 'Orsten' type phosphatised softintegument preservation and a new record from the middle Cambrian Kuonamka Formation in Siberia. *Neues Jahrb. Geol. Paläontol. Abh.* 1995;197: 101–118.
6. Maas A, Waloszek D. Cambrian derivatives of the early arthropod stem lineage, pentastomids, tardigrades and lobopodians—an 'Orsten' perspective. *Zool Anz.* 2001; 240: 451–459.

7. Kinchin I. *The Biology of Tardigrades*. London: Portland Press; 1994.
8. Altiero T, Guidetti R, Caselli V, Cesari M, Rebecchi L. Ultraviolet radiation tolerance in hydrated and desiccated eutardigrades. *J Zool Syst Evol Res* 2011; 49 (Suppl. 1)104–110.
9. Jönsson KI, Rabbow E, Schill RO, Harms-Ringdahl M, Rettberg P. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Curr Biol*. 2008; 18: R729–R731.
10. Ono F, Mori Y, Sougawa M, Takarabe K, Hada Y, Nishihira N, et al. Effect of very high pressure on life of plants and animals, *J. Phys. Conf. Series* 2012; 377: 012053-6p.
11. Ramløv H, Westh P. Cryptobiosis in the Eutardigrade *Adorybiotus* (*Richtersius*) coronifer: Tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. *Zool Anz*. 2001; 240: 517–523.
12. Jönsson KI, Harms-Ringdahl M, Torudd J. Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Int J Radiat Biol*. 2005; 81: 649–656.
13. Baumann H. Die Anabiose der Tardigraden. *Zoologische Jahrbuch* 1992, 501–556.
14. Marcus E. *Tardigrada*. In: *Klassen und Ordnungen des Tierreichs* (Bronn HG, ed.), Bd. 5, Abtlg. IV, Buch 3. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft; 1929.
15. Keilin D. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1959; 150: 149–191.
16. Walz B. The morphology of cells and cell organelles in the anhydrobiotic tardigrade, *Macrobotus hufelandi* *Protoplasma*. 1979; 99: 19–30
17. Rizzo AM, Negroni M, Altiero T, Montorfano G, Corsetto P, Berselli P, et al. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobotus richtersi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2010; 156: 115-121.
18. Wełnicz W, Grohme MA, Kaczmarek L, Schill RO, Frohme M. Anhydrobiosis in tardigrades--the last decade. *Journal of Insect Physiology*. 2011; 57: 577–583.

19. Reuner A, Hengherr S, Mali B, Förster F, Arndt D, Reinhardt R, et al. Stress response in tardigrades: differential gene expression of molecular chaperones. *Cell Stress & Chaperones*. 2010; 15: 423–430.
20. Schokraie E, Hotz-Wagenblatt A, Warnken U, Mali B, Frohme M, Förster F, et al. Proteomic analysis of tardigrades: towards a better understanding of molecular mechanisms by anhydrobiotic organisms. *PLoS One*. 2010; 5: e9502.
21. Yamaguchi A, Tanaka S, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C, Imajoh-Ohmi S, et al. Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. *PLoS One*. 2012.; 7: e44209.
22. Kondo K, Kubo T, Kunieda T. Suggested Involvement of PP1/PP2A Activity and De Novo Gene Expression in Anhydrobiotic Survival in a Tardigrade, *Hypsibius dujardini*, by Chemical Genetic Approach. *PLoS One*. 2015; 10: e0144803.
23. Jönsson KI, Schill RO. Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2007; 146: 456-60.
24. Horikawa DD, Cumbers J, Sakakibara I, Rogoff D, Leuko S, Harnoto R. et al. Analysis of DNA repair and protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after exposure to UVC radiation. *PLoS One*. 2013; 8: e64793.
25. Hengherr S, Heyer AG, Köhler HR, Schill RO. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades--evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS J*. 2008; 275: 281-288.
26. Rebecchi L, Cesari M, Altiero T, Frigieri A, Guidetti R. Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades. *J Exp Biol*. 2009; 212: 4033-9.
27. Guidetti R, Altiero T, Rebecchi L. On dormancy strategies in tardigrades. *J Insect Physiol*. 2011; 57: 567-76.
28. Erkut C, Vasilj A, Boland S, Habermann B, Shevchenko A, Kurzchalia TV. Molecular Strategies of the *Caenorhabditis elegans* Dauer Larva to Survive Extreme Desiccation. *PLoS ONE*. 2013; 8: e82473.



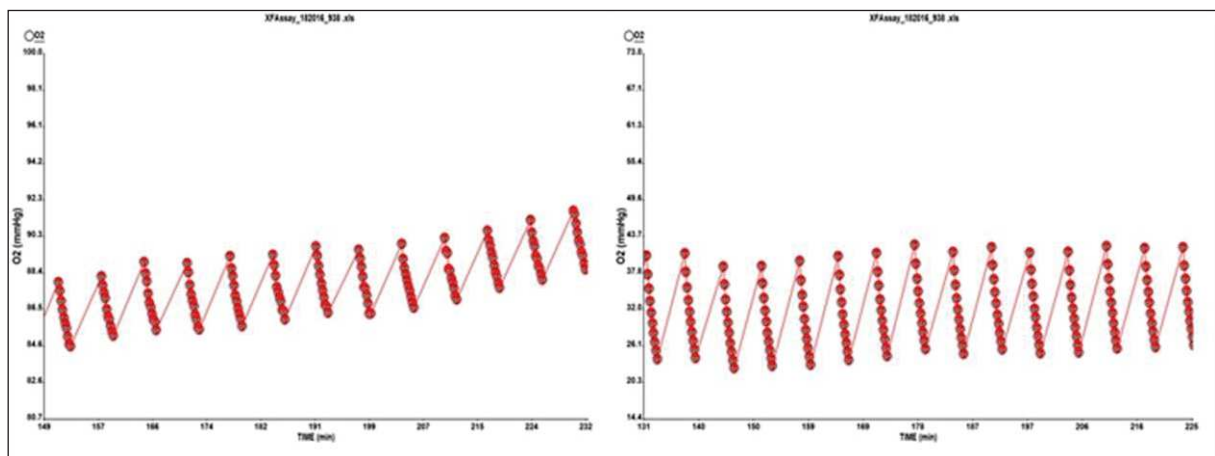
29. Ono F, Saigusa M, Uozumi T, Matsushima Y, Ikeda H, Saini NL, et al. Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade, *J. Phys. Chem. Sol.* 2008; 69: 2297-2300.
30. Ono F, Mori Y, Takarabe K, Fujii A, Saigusa M, Matsushima Y et al. Effect of ultra-high pressure on small animals, tardigrades and *Artemia*. *Cogent Physics*. 2016; 3: 1167575.
31. Clegg JS. Do dried cryptobioties have a metabolism? In Crowe JH, Clegg JS, editors *Anhydrobiosis* 1973: 141-146.
32. Wrigh JC, Westh P, Ramlov H. Cryptobiosis in Tardigrada. *Biol. Rev.* 1992; 67: 1-29.
33. Pigon A, and Weglarska B. Rate of metabolism in tardigrades during Active life and Anabiosis. *Nature*. 1955; 176: 122–123.
34. Tsujimoto M, Imura S, Kanda H. Recovery and reproduction of an Antarctic tardigrade retrieved from a moss sample frozen for over 30 years. *Cryobiology*. 2016; 72: 78-81.
35. Tanaka S, Tanaka J, Miwa Y, Horikawa DD, Katayama T, Arakawa K, et al. Novel Mitochondria-Targeted Heat-Soluble Proteins Identified in the Anhydrobiotic Tardigrade Improve Osmotic Tolerance of Human Cells. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0118272.
36. Klekowski RZ, Opalinski, KW. Oxygen consumption in Tardigrada from Spitsbergen. *Polar Biology*. 1989; 9: 299–303.
37. Jönsson KI, Rebecchi L. Experimentally induced anhydrobiosis in the tardigrade *Richtersius coronifer*: phenotypic factors affecting survival. *J Exp Zool*. 2002; 293: 578-84.
38. Haughland R. Molecular probes. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 10th Edition ed. Eugene OR, Editor. Molecular Probes Inc. 862pp; 2009
39. Yang W, Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*. 2010; 8: e1000556.
40. Savic AG, Guidetti R, Turi A, Pavicevic A, Giovannini I, Rebecchi L, et al. Superoxide Anion Radical Production in the Tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*, the First Electron Paramagnetic Resonance Spin-Trapping Study. *Biochem Zool*. 2015; 88: 451-454.

41. Halberg KA, Jørgensen A, Møbjerg N. Desiccation Tolerance in the Tardigrade *Richtersius coronifer* Relies on Muscle Mediated Structural Reorganization. PLoS ONE. 2013; 8: e85091.
42. Dancy BM, Brockway N, Ramadasan-Nair R, Yang Y, Sedensky MM, Morgan PG. Glutathione S-transferase mediates an ageing response to mitochondrial dysfunction. Mech Ageing Dev. 2016; 153: 14-21.
43. Gabriel WN, McNuff R, Patel SK, Gregory TR, Jeck WR, Jones CD, et al. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. Dev Biol. 2007; 312: 545-59.
44. Poot M, Zhang YZ, Krämer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. J Histochem Cytochem. 1996; 44: 1363-1372.
45. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. Cold Spring Harb Protoc. 2011; 1: 990-992.
46. Poot M, Gibson LL, Singer VL. Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. Cytometry. 1997; 27: 358-364.
47. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. Biotechniques. 2011; 50: 98-115.
48. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol. 1992; 5: 227-231.
49. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 29,79 dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. Biochem Pharmacol. 2003; 65: 1575-1582.

## 7 – Supporting information captions.

### S1 figure. Oxygen tension evolution time course.

These two graphs depict the oxygen tension (mm Hg of O<sub>2</sub>) evolution with respect to time in two representative wells of living controls tardigrade. Both times window shown corresponds to the central part on the whole measurement kinetic. Accordingly to the supplier, a little variation between the starting point and subsequent measures means that the O<sub>2</sub> sensor have enough time during steps of mixing and waiting to re-equilibrates to ambient O<sub>2</sub> of the well media. The slight variations range observed on the Y axis between starting O<sub>2</sub> tension and successive measurements confirms that collected data are within the error specification of the instrument.



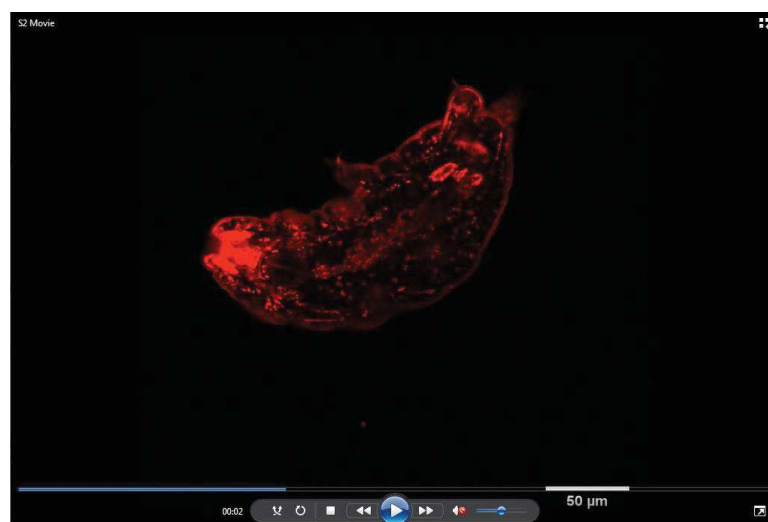
**S1 Movie. Time-lapse movie of anhydrobiotic outgoing tardigrade at 150 minutes after anhydrobiosis exit initiation reveals earlier movements.**

This time-lapse movie presents first movements detection by light microscopy of tardigrade during the time course of anhydrobiotic exit (150 minutes after anhydrobiosis exit initiation). The time-lapse represents image collection during 20 seconds with a light microscope (Stemi 508, Zeiss, Germany).



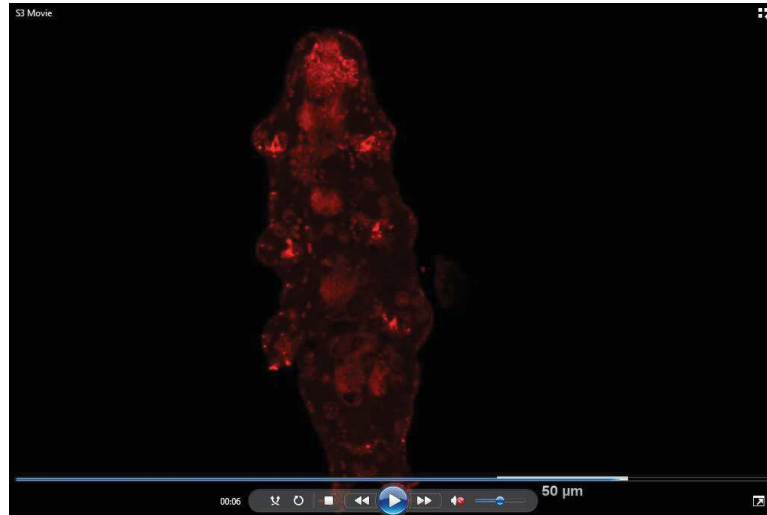
**S2 Movie. Time-lapse movie of a living tardigrade stained with Mitotracker red CMXRos highlight mitochondria structures.**

This time-lapse was obtained on confocal microscope (as described in materials and methods) and show animal motion during 8 seconds which highlight mitochondria structures (see results section for description).



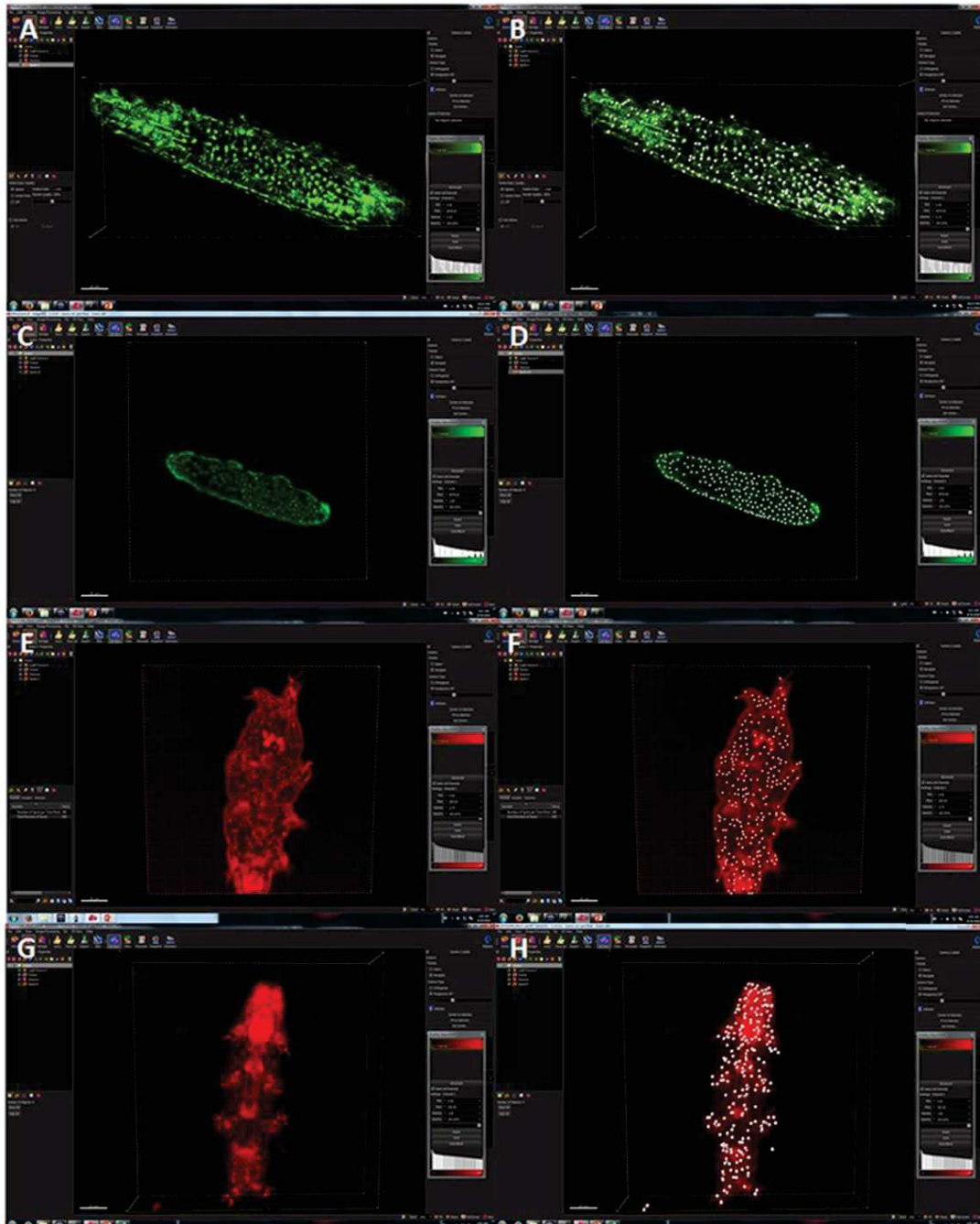
**S3 Movie. Time-lapse movie of a living tardigrade stained with Mitotracker red CMXRos highlight moving storage cells inside animals.**

This time-lapse was obtained on confocal microscope (as described in materials and methods) and show storage cells motion inside animal during 8 seconds (storage cells movements can be observed during the time window 3-6 seconds) revealed by the mitochondria specific Mitotracker red CMXRos dye.



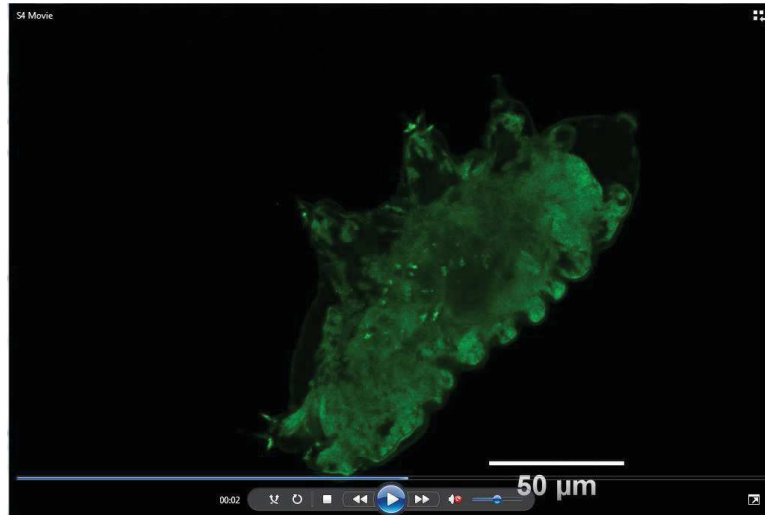
**S2 Figure. Mitochondria specific dyes allowed to counts storage cells.**

Living tardigrade were stained with either Mitotracker green FM (A-D) or Mitotracker red CMXRos (E-H) dyes and observed on confocal microscope (as described in materials and methods). To quantify the number of storage vesicles we used Imaris 8.3 software (Bitplane) on figures A, C, E, G. First we detect the 3  $\mu$ m minimal diameter structure then Imaris software counted the number of dots defined and produced the corresponding B, D, F, H pictures and total storage cells counts (see text for explanation).



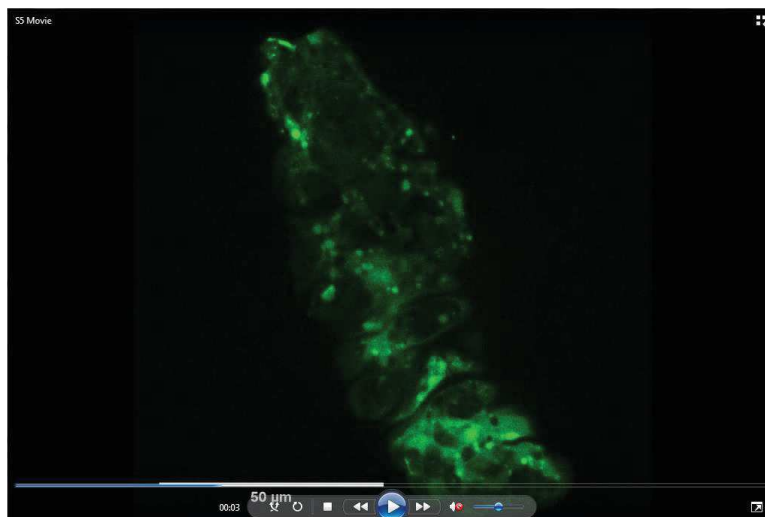
**S4 Movie. Mitotracker green FM dye staining of animal in the course of rehydration.**

Tardigrade were stained with Mitotracker green FM dye then observed on confocal microscope (as described in materials and methods) at 1h49 after rehydration initiation. The pictures represent animals in the course of rehydration revealed by fluorescent confocal microscopy for mitochondria dye detection that do not reveal any discernable cell structure at this time but a faint staining instead.

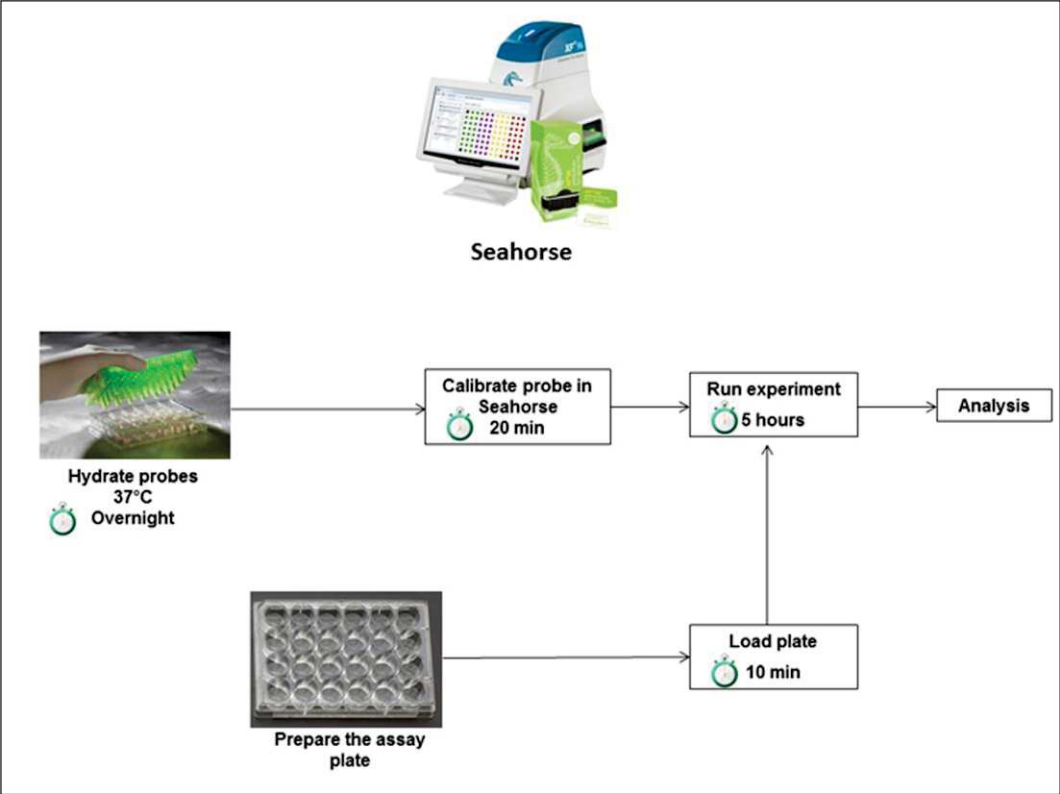


**S5 Movie. Mitotracker green FM dye staining of living animal.**

Living tardigrades were stained with Mitotracker green FM dye then observed on confocal microscope (as described in materials and methods). The movie allows to detect internal cell structures with coelomic storage cells as well a pharynx muscle cells.

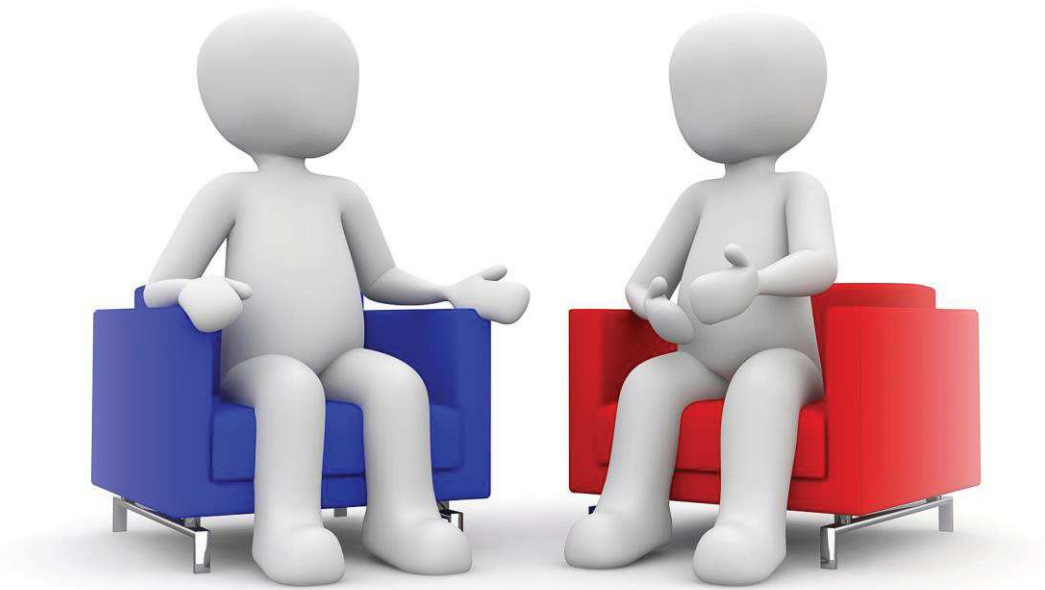


S3 figure. Seahorse workflow





### ***III – DISCUSSION***



Dans cette étude, nous avons évalué, pour l'espèce de tardigrade *H. dujardini*, le fonctionnement mitochondrial et la respiration.

A l'aide du système Seahorse, nous avons réussi à mesurer le taux de consommation en oxygène des individus et découvert que la sortie d'anhydrobiose chez ces animaux nécessite cinq heures pour être totale.

En utilisant la courbe de respiration des tardigrades dans le temps en sortie d'anhydrobiose, nous avons détecté un mécanisme en deux étapes qui soutient l'hypothèse de deux phases critiques successives avec des cinétiques différentes : une phase précoce qui permet aux tardigrades de récupérer 50% de leur capacité de respiration, suivie d'une phase plus lente qui augmente la respiration jusqu'à une récupération complète identique aux individus vivants. Cette cinétique en deux étapes reflète probablement des différences dans les mécanismes engagés durant ces deux périodes.

Les mitochondries représentent la source principale de l'activité métabolique chez les êtres vivants. C'est pourquoi nous avons regardé les mitochondries *in situ* dans les individus. Pour ce faire, nous avons utilisé des marqueurs spécifiques de la mitochondrie.

Les mitotracker nous ont permis de mettre en avant le mouvement des cellules de stockage à l'intérieur des individus vivants ainsi que des variations dans le marquage mitochondrial en fonction du niveau énergétique des tissus.

Le marquage mitochondrial nous a également permis de réaliser une numération et une évaluation de la taille des cellules de réserve. Ces deux valeurs obtenues (nombre et taille) sont cohérentes avec les valeurs retrouvées dans la littérature jusqu'à présent (Reuner et al., 2010).

Le marquage des mitochondries *in vivo* a permis de révéler également une possible hiérarchie dans la réorganisation des tissus en sortie d'anhydrobiose. Sur la base des images obtenues à la fois avec les mitotracker et un marqueur de fluorescence spécifique des radicaux libres, il semble que les cellules de stockage se réactivent très rapidement. Cette réactivation est suivie, dans un second temps, par la réactivation des tissus des muscles internes comme les muscles du pharynx.

En utilisant différentes drogues, une récente étude (Halberg et al., 2013) a montré l'implication de l'énergie des mitochondries et des muscles sur la formation des tun et la survie du tardigrade *Richtersius coronifer*. Cependant, ce travail n'évalue pas la possible implication des mitochondries des cellules de stockage pour l'entrée ou la sortie d'anhydrobiose.

Ainsi, il est possible que les différences observées dans la réactivation des tissus soient à l'origine de la cinétique en deux étapes observée lors du processus de sortie d'anhydrobiose.

L'utilisation du marqueur indicateur des radicaux libres a permis de montrer que le tardigrade *H. dujardini* subit un stress oxydant en sortie d'anhydrobiose comme indiqué dans un précédent rapport par des preuves indirectes (Rizzo et al., 2010).

De nouvelles techniques, comme la résonance de spin électronique ou le marquage MitoSox (Savic et al., 2015; Dancy et al., 2016), vont permettre de faciliter l'accès aux compartiments subcellulaires d'animaux tels que les tardigrades et nématodes. Ces méthodes pourront ainsi aider à l'évaluation de la consommation en

oxygène et la production de radicaux libres, ou encore faciliter les analyses *in situ* avec une possible discrimination tissulaire.  
Utilisées en combinaison, l'ensemble de ces techniques vont contribuer à une meilleure compréhension de ce qui se passe vraiment lorsqu'un tardigrade déshydraté revient à la vie.

***DISCUSSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES***

Comprendre les mécanismes de sénescence ou développer de nouveaux anti-cancéreux impose d'utiliser des modèles divers et complémentaires. De par sa facilité de mise en œuvre, la culture cellulaire est une des méthodes les plus employées. Cependant, travailler sur cellules isolées ne permet pas toujours d'extrapoler les résultats à des conditions plus complexes comme un organisme entier. Les biologistes disposent alors de modèles intégrés plus ou moins évolués : levures, zebrafish, xénopes, drosophiles, rongeurs, ... Leur mise en œuvre est parfois difficile, tant d'un point de vue administratif (réglementation sur l'expérimentation animale) que technologique (durée de vie, reproduction, coût, ...).

L'objectif de notre travail a été d'initier le développement de deux nouveaux modèles biologiques intégrés (*Caenorhabditis elegans* et *Hypsibius dujardini*), plus facilement manipulables et présentant de nombreux avantages (coût, temps de développement, taille, ...), pour des études en oncopharmacologie et sénescence.

Ce chapitre de conclusion est divisé en deux parties. Dans la première partie, nous décrivons les différentes conclusions obtenues sur le modèle *C. elegans* ainsi que les perspectives de notre travail. Dans la seconde partie, nous présenterons les conclusions obtenues sur *H. dujardini* et les approches à développer.

### **Modèle *Caenorhabditis elegans***

Le potentiel de *C. elegans* a été évalué au travers de deux axes :

- Nous avons tout d'abord utilisé le modèle nématode pour déterminer les potentiels toxiques, mutagènes et cancérigènes de gaz candidats au remplacement du gaz SF6.

Notre étude a permis de conclure qu'aucun des trois nouveaux gaz testés ne convient pour remplacer le gaz SF6. En effet, malgré les problèmes de gaz à effet de serre qu'il engendre, le SF6 est non toxique et non mutagène. Le gaz X est, lui, toxique et mutagène. De nombreux phénotypes particuliers ainsi que des malformations ont été observés. Le gaz Y semble beaucoup plus intéressant d'un point de vue toxicité et mutagénicité. Malheureusement, ses médiocres propriétés diélectriques ne font pas de lui un bon candidat. Le gaz Z présente quant à lui une double toxicité. En effet, après une toxicité immédiate importante, une toxicité différée apparaît avec des malformations entraînant la mort des individus. Ce gaz est également potentiellement neurotoxique avec un phénomène de fuite, de dispersion, très important sur la descendance.

Les résultats de toxicité ont été confortés par les études sur le modèle souris menées en parallèle. Le dosage des métabolites par RMN après exposition au gaz X a décelé les mêmes métabolites dans les deux modèles. De plus, l'effet toxique de X et le double effet toxique de Z ont également été obtenus chez la souris.

Pour ce type d'étude sur les gaz, les deux modèles nématodes et souris sont donc complémentaires. La cohérence des résultats montre l'utilité et la pertinence du modèle *C. elegans* pour les études en toxicologie des gaz.

- A l'aide du Seahorse XF24 Analyzer, nous avons mis au point un test fonctionnel original : la mesure de la respiration mitochondriale du nématode entier.

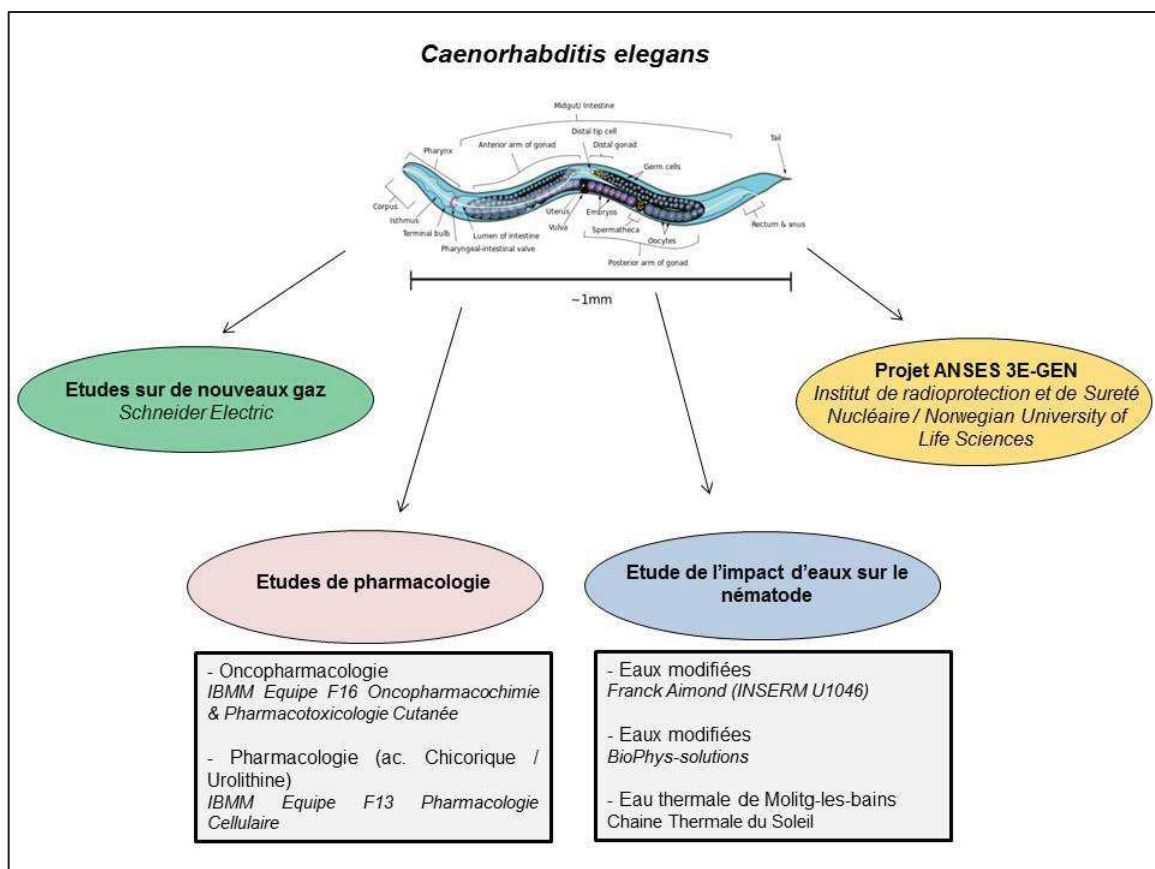
Notre étude nous a permis de déterminer des valeurs de référence, obtenues à partir d'un grand nombre d'individus et à partir de plusieurs répliquats, pour différentes souches de *C. elegans* : la souche sauvage N2, des mutants de la chaîne respiratoire mitochondriale (*mev-1*, *clk-1*, *isp-1*) et un mutant de la voie *aak-2* (AMP-Activated Protein kinase). Ces valeurs nous permettront dans le futur d'utiliser l'outil Seahorse pour des études de toxicologie et de mécanistique.

Sur ce modèle nématode, de nombreux projets sont d'ores et déjà envisagés avec des partenaires industriels, des équipes de recherche et les autres chercheurs de l'équipe. Des collaborations ou des études seront lancées très prochainement ou sont en cours. Celles-ci sont présentées dans la figure 33.

Les perspectives ouvertes suite à ce travail sont nombreuses :

- études en oncopharmacologie,
- études sur de nouveaux gaz,
- études de l'impact d'eaux sur ce modèle (en termes de toxicité, vieillissement,...),
- projet ANSES en collaboration avec l'IRSN **3E-GEN** « Etude des Effets d'une exposition chronique à de faibles doses de stressseurs cancérogènes à l'aide du modèle biologique *Caenorhabditis elegans* »

Figure 33 : Perspectives et projets à venir sur le modèle nématode *Caenorhabditis elegans*



## Modèle *Hypsibius dujardini*

Nous avons choisi de développer comme second modèle *Hypsibius dujardini*, beaucoup moins travaillé que *C. elegans*. C'est un tardigrade connu pour sa résistance aux conditions extrêmes, notamment à la dessiccation.

Afin de mieux comprendre cette résistance, nous avons choisi d'analyser la consommation en oxygène de cette espèce de tardigrades dans son état vivant et en sortie d'anhydrobiose comme marqueur de la fonction mitochondriale. Nous avons trouvé que la consommation en oxygène du tardigrade durant la sortie d'anhydrobiose se déroule en deux étapes : une phase précoce permettant aux individus de récupérer 50% de leur capacité de respiration puis une phase plus lente qui leur permet d'obtenir une récupération complète, identique aux individus vivants.

Nous avons ensuite analysé les mitochondries *in situ* dans leurs trois états (vivants, déshydratés et en cours de réhydratation) en utilisant des marqueurs spécifiques de la mitochondrie. Nous avons ainsi pu compter le nombre de cellules de stockage des animaux ( $237 \pm 32$ ) et enregistrer leurs mouvements dans l'organisme entier.

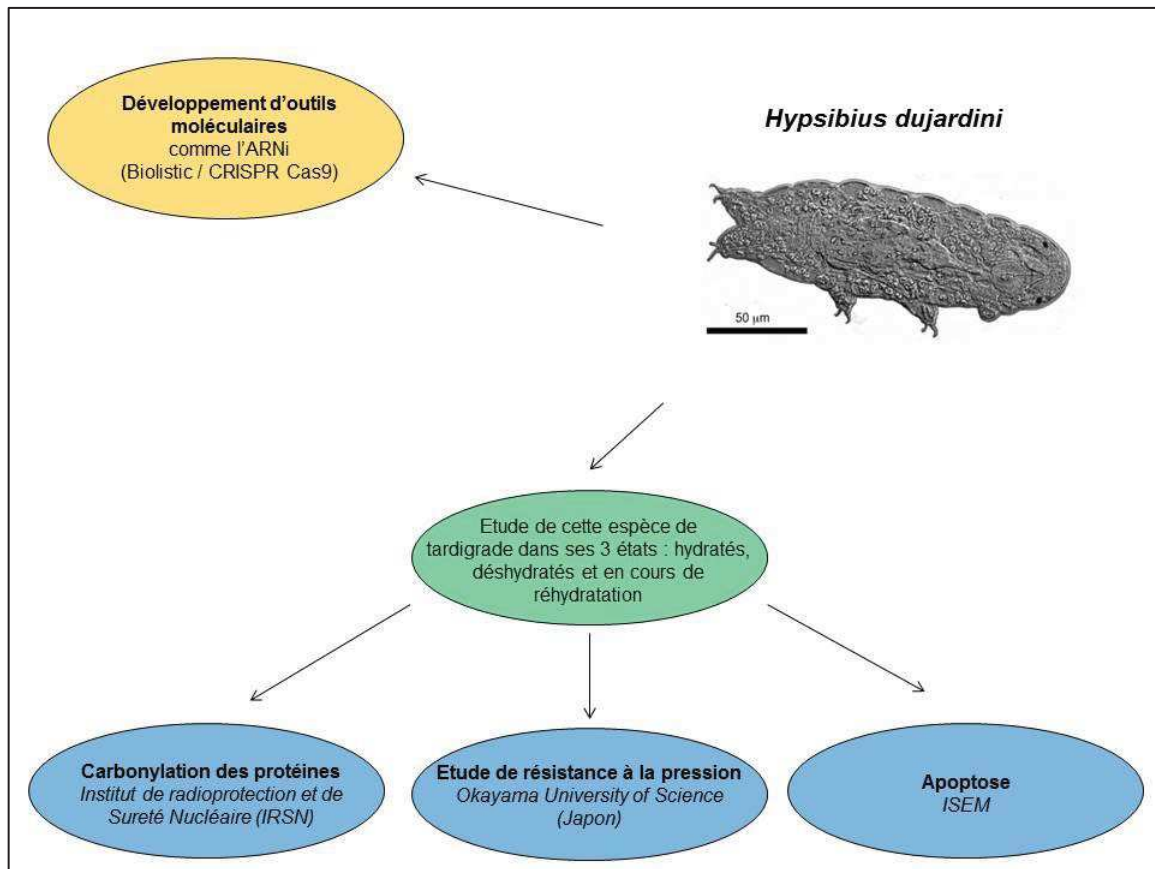
Nous avons également analysé l'organisation du réseau mitochondrial dans les tardigrades vivants et en cours de réhydratation.

Pour finir, en utilisant un marqueur sensible aux radicaux libres, nous avons pu mettre en évidence un stress oxydant qui apparaît lors de la sortie d'anhydrobiose.

La fonction mitochondriale varie en fonction de la localisation tissulaire. Ainsi, nos travaux suggèrent que la réhydratation des tissus durant la sortie d'anhydrobiose se fait selon un mécanisme séquentiel.

Sur ce modèle *H. dujardini*, quelques perspectives sont présentées dans la figure 34. Des études sur les trois états des tardigrades (vivants, déshydratés et cours de réhydratation) sont en cours avec des essais de résistance aux pressions, des tests de carbonylation des protéines, des mesures d'apoptose,... dans le but de mieux connaître ce modèle et de l'utiliser en toxicologie et en oncopharmacologie. Un développement d'outils moléculaires sur ce modèle avec notamment la mise au point de l'ARNi par la méthode CRISPR Cas9 est également à réaliser.

Figure 34 : Perspectives et projets à venir sur le modèle tardigrade *Hypsibius dujardini*



Sur la base des études réalisées sur ces deux modèles, nous pourrons, au sein du laboratoire de toxicologie de la faculté de pharmacie de Montpellier, utiliser les nématodes et tardigrades comme outils, seuls ou en combinaison, pour diverses études de toxicologie, sénescence et oncopharmacologie.



## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Aguinaldo, A., Turbeville, J., Linford, L., Rivera, M., Garey, J., Raff, R., and Lake, J. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 29, 489–493.
- Altiero, T., Guidetti, R., Caselli, V., Cesari, M., and Rebecchi, L. (2011). Ultraviolet radiation tolerance in hydrated and desiccated eutardigrades : Ultraviolet radiation tolerance in eutardigrades. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49, 104–110.
- Altun, Z.F., and Hall, D.H. (2009). Introduction. In *WormAtlas*.
- Ammermann, D. (1967). Die Cytologie der Parthenogenese bei dem Tardigraden *Hypsibius dujardini*. *Chromosoma* 23, 203–213.
- Andersen, E.C., Gerke, J.P., Shapiro, J.A., Crissman, J.R., Ghosh, R., Bloom, J.S., Félix, M.-A., and Kruglyak, L. (2012). Chromosome-scale selective sweeps shape *Caenorhabditis elegans* genomic diversity. *Nature Genetics* 44, 285–290.
- Andreux, P.A., Mouchiroud, L., Wang, X., Jovaisaite, V., Mottis, A., Bichet, S., Moullan, N., Houtkooper, R.H., and Auwerx, J. (2014). A method to identify and validate mitochondrial modulators using mammalian cells and the worm *C. elegans*. *Scientific Reports* 4, 5285.
- Angelo, G., and Van Gilst, M.R. (2009). Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science* 326, 954–958.
- Araiz, C., Chateau, M.-T., and Galas, S. (2008). 14-3-3 regulates life span by both DAF-16-dependent and -independent mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 43, 505–519.
- Arakawa, K. (2016). No evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E3057–E3057.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495.
- Barrière, A., and Félix, M.-A. (2005). High Local Genetic Diversity and Low Outcrossing Rate in *Caenorhabditis elegans* Natural Populations. *Current Biology* 15, 1176–1184.
- Beltrán-Pardo, E., Jönsson, K.I., Harms-Ringdahl, M., Haghdoost, S., and Wojcik, A. (2015). Tolerance to Gamma Radiation in the Tardigrade *Hypsibius dujardini* from Embryo to Adult Correlate Inversely with Cellular Proliferation. *Plos One* 10, e0133658.

- Bemm, F., Weiß, C.L., Schultz, J., and Förster, F. (2016). Genome of a tardigrade: Horizontal gene transfer or bacterial contamination? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E3054–E3056.
- Bertolani, R. (1987). Sexuality, reproduction, and propagation in tardigrades. (Mucchi, Modena, Italy: R. Bertolani (ed.)), pp. 101–193.
- Bertolani, R., and Rebecchi, L. (1999). Tardigrada. In *Encyclopedia of Reproduction*, (San Diego), pp. 703–717.
- Bertolani, R., Guidetti, R., Jönsson, I.K., Altiero, T., Boschini, D., and Rebecchi, L. (2004). Experiences with dormancy in tardigrades. *Journal of Limnology* 63, 16–25.
- Bobinnec, Y. (2003). L'apport des modèles animaux en biologie cellulaire. *Médecine Sciences* 19, 248–251.
- Boothby, T.C., Tenlen, J.R., Smith, F.W., Wang, J.R., Patanella, K.A., Osborne Nishimura, E., Tintori, S.C., Li, Q., Jones, C.D., Yandell, M., et al. (2015). Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 15976–15981.
- Borner, J., Rehm, P., Schill, R.O., Ebersberger, I., and Burmester, T. (2014). A transcriptome approach to ecdysozoan phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 80, 79–87.
- Boudon, R., Damisch, H., Goguel, J., Guinand, S., Jaulin, B., Mouloud, N., Richard, J.-F., and Victorri, B. (2016). MODELE. *Encyclopædia Universalis [en ligne]*, consulté le 23 août 2016. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/modele/>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Brenner, S. (2001). *My Life in Science*. Biomed Central Ltd
- Buisset-Goussen, A. (2014). Etude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique aux rayonnements ionisants chez un organisme modèle: le nématode *Caenorhabditis elegans*. Université Aix-Marseille.
- Byerly, L., Scherer, S., and Russell, R.L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 51, 34–48.
- Cabreiro, F., Au, C., Leung, K.-Y., Vergara-Irigaray, N., Cochemé, H.M., Noori, T., Weinkove, D., Schuster, E., Greene, N.D.E., and Gems, D. (2013). Metformin Retards Aging in *C. elegans* by Altering Microbial Folate and Methionine Metabolism. *Cell* 153, 228–239.
- Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282, 2012–2018.

- Campbell, L.I., Rota-Stabelli, O., Edgecombe, G.D., Marchioro, T., Longhorn, S.J., Telford, M.J., Philippe, H., Rebecchi, L., Peterson, K.J., and Pisani, D. (2011). MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15920–15924.
- Cassada, R.C., and Russell, R.L. (1975). The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 46, 326–342.
- Cerutti, H., and Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics* 50, 81–99.
- Chen, J., and Caswell-Chen, E.P. (2004). Facultative vivipary is a life-history trait in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology* 36, 107-113.
- Christophorou, L., Olthoff, J., and Van Brunt, R. (1997). Sulfur hexafluoride and the electric power industry. *IEEE Electrical Insulation Magazine* 13, 20–24.
- Clegg, J.S. Do dried cryptobioties have a metabolism? In *Anhydrobiosis*, pp. 141–146.
- Copley, R.R., Aloy, P., Russell, R.B., and Telford, M.J. (2004). Systematic searches for molecular synapomorphies in model metazoan genomes give some support for Ecdysozoa after accounting for the idiosyncrasies of *Caenorhabditis elegans*. *Evolution & Development* 6, 164–169.
- Corsi, A.K., Wightman, B., and Chalfie, M. (2015). A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. In *WormBook*.
- Crowe, J.H. (1975). The physiology of cryptobiosis in tardigrades. *Memoirs Dell'Istituto Ztuliuno Di Zdtobiologicu, Pallanra* 32, 37–59.
- Cypser, J.R., Tedesco, P., and Johnson, T.E. (2006). Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 41, 935–939.
- Dancy, B.M., Brockway, N., Ramadasan-Nair, R., Yang, Y., Sedensky, M.M., Morgan, P.G. (2016). Glutathione S-transferase mediates an ageing response to mitochondrial dysfunction. *Mech Ageing Dev.* 153, 14-21.
- Dancy, B.M., Kayser, E.-B., Sedensky, M.M., and Morgan, P.G. (2013). Live worm respiration in 24-well format. *The Worm Breddder's Gazette* 19, 11–12.
- Degma, P., and Guidetti, R. (2007). Notes to the current checklist of Tardigrada. *Zootaxa* 1579, 41–53.
- Degma, P., Bertolani, R., and Guidetti, R. (2015). Actual checklist of tardigrada species (2009-2015, Ver. 29: 15-12-2015).

- Delmont, T.O., and Eren, A.M. (2016). Identifying contamination with advanced visualization and analysis practices: metagenomic approaches for eukaryotic genome assemblies. *PeerJ* 4, e1839.
- Denver, D.R., Morris, K., Lynch, M., and Thomas, W.K. (2004). High mutation rate and predominance of insertions in the *Caenorhabditis elegans* nuclear genome. *Nature* 430, 679–682.
- Dewel, R.A., and Dewel, W.C. (1996). The brain of *Echiniscus viridissimus* Peterfi, 1956 (Heterotardigrada): a key to understanding the phylogenetic position of tardigrades and the evolution of the arthropod head. *Zoological Journal of the Linnean Society* 116, 35–49.
- Dopazo, H., and Dopazo, J. (2005). Genome-scale evidence of the nematode-arthropod clade. *Genome Biology* 6, R41.
- Doyère, P.L.N. (1842). Mémoires sur les Tardigrades. Sur la facilité que possèdent les Tardigrades, les rotifères, les anguillules des toits et quelques autres animalcules, de revenir à la vie après été complètement desséchées. *Annales Des Sciences Naturelles* 18.
- Dunn, C.W., Hejnol, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., et al. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–749.
- Eibye-Jacobsen, J. (1997). Development, Ultrastructure and Function of the Pharynx of *Halobiotus crispae* Kristensen, 1982 (Eutardigrada). *Acta Zoologica* 78, 329–347.
- Erkut, C., Penkov, S., Khesbak, H., Vorkel, D., Verbavatz, J.-M., Fahmy, K., and Kurzchalia, T.V. (2011). Trehalose Renders the Dauer Larva of *Caenorhabditis elegans* Resistant to Extreme Desiccation. *Current Biology* 21, 1331–1336.
- Erkut, C., Vasilij, A., Boland, S., Habermann, B., Shevchenko, A., and Kurzchalia, T.V. (2013). Molecular Strategies of the *Caenorhabditis elegans* Dauer Larva to Survive Extreme Desiccation. *Plos One* 8, e82473.
- Ewbank, J. (2006). Signaling in the immune response. In *WormBook*.
- Félix, M.-A., and Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 20, R965–R969.
- Feng, J., Bussièrre, F., and Hekimi, S. (2001). Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell* 1, 633–644.
- Fernie, A.R., Carrari, F., and Sweetlove, L.J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 254–261.

- Finch, C.E., and Ruvkun, G. (2001). The Genetics Of Aging. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2, 435–462.
- Forster, F., Daniela Beisser, Markus A. Grohme, Chunguang Liang, Brahim Mali, Alexander Matthias Siegl, Julia C. Engelmann, Shkumatov, A., Elham Schokraie, Tobias Müller, et al. (2012). Transcriptome Analysis in Tardigrade Species Reveals Specific Molecular Pathways for Stress Adaptations. *Bioinformatics and Biology Insights* 6, 69–96.
- Gabriel, W.N., and Goldstein, B. (2007). Segmental expression of Pax3/7 and Engrailed homologs in tardigrade development. *Development Genes and Evolution* 217, 421–433.
- Gabriel, W.N., McNuff, R., Patel, S.K., Gregory, T.R., Jeck, W.R., Jones, C.D., and Goldstein, B. (2007). The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. *Developmental Biology* 312, 545–559.
- Giribet, G., and Ribera, C. (1998). The Position of Arthropods in the Animal Kingdom: A Search for a Reliable Outgroup for Internal Arthropod Phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9, 481–488.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science* 274, 546–567.
- Golden, J.W., and Riddle, D.L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology* 102, 368–378.
- Gross, V., and Mayer, G. (2015). Neural development in the tardigrade *Hypsibius dujardini* based on anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin immunolabeling. *Evolution & Development* 6, 12.
- Guidetti, R., and Bertolani, R. (2005). Tardigrade taxonomy: an updated check list of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa* 845, 1–46.
- Guidetti, R., Altiero, T., and Rebecchi, L. (2011). On dormancy strategies in tardigrades. *Journal of Insect Physiology* 57, 567–576.
- Guil, N., and Cabrero-Sañudo, F.J. (2007). Analysis of the species description process for a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). *Biodiversity and Conservation* 16, 1063–1086.
- Halberg, K.A., Jørgensen, A., Møbjerg, N. (2013). Desiccation Tolerance in the Tardigrade *Richtersius coronifer* Relies on Muscle Mediated Structural Reorganization. *PLoS ONE* 8: e85091.
- Hand, S.C. (1991). Metabolic Dormancy in Aquatic Invertebrates. In *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–50.

- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* 418, 244–251.
- Hart, A. (2006). Behavior. In *WormBook*.
- Hartman, P.S., Barry, J., Finstad, W., Khan, N., Tanaka, M., Yasuda, K., and Ishii, N. (2014). Ethyl methanesulfonate induces mutations in *Caenorhabditis elegans* embryos at a high frequency. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 766–767, 44–48.
- Hengherr, S., Heyer, A.G., Köhler, H.-R., and Schill, R.O. (2008). Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades - evidence for divergence in responses to dehydration: Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades. *FEBS Journal* 275, 281–288.
- Hodgkin, J., and Doniach, T. (1997). Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 146, 149–164.
- Horikawa, D.D., Sakashita, T., Katagiri, C., Watanabe, M., Kikawada, T., Nakahara, Y., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., Higashi, S., et al. (2006). Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *International Journal of Radiation Biology* 82, 843–848.
- Horikawa, D.D., Kunieda, T., Abe, W., Watanabe, M., Nakahara, Y., Yukuhiro, F., Sakashita, T., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., et al. (2008). Establishment of a Rearing System of the Extremotolerant Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* : A New Model Animal for Astrobiology. *Astrobiology* 8, 549–556.
- Horikawa, D.D., Iwata, K.-I., Kawai, K., Koseki, S., Okuda, T., and Yamamoto, K. (2009). High Hydrostatic Pressure Tolerance of Four Different Anhydrobiotic Animal Species. *Zoological Science* 26, 238–242.
- Horikawa, D.D., Cumbers, J., Sakakibara, I., Rogoff, D., Leuko, S., Harnoto, R., Arakawa, K., Katayama, T., Kunieda, T., Toyoda, A., et al. (2013). Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after Exposure to UVC Radiation. *Plos One* 8, e64793.
- Horvitz, H.R., Brenner, S., Hodgkin, J., and Herman, R.K. (1979). A uniform genetic nomenclature for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and General Genetics* 175, 129–133.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Turrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
- International Electrotechnical Commission (1995). Appareillage à haute tension – Utilisation et manipulation de gaz hexafluorure de soufre (SF6) dans l'appareillage à haute tension. Rapport Technique CEI TR 61634.

- International Electrotechnical Commission (2005). Spécifications de la qualité technique de l'hexafluorure de soufre (SF6) pour utilisation dans les appareils électriques. Norme Internationale CEI IEC 60376.
- Ishii, N., Takahashi, K., Tomita, S., Keino, T., Honda, S., Yoshino, K., and Suzuki, K. (1990). A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutation Research* 237, 165-171.
- Johannsen, D.L., and Ravussin, E. (2009). The role of mitochondria in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 780–786.
- Jöhnson, K.I., Harms-Ringdahl, M., and Torudd, J. (2005). Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *International Journal of Radiation Biology* 81(9), 649-656.
- Jönsson, K.I., and Schill, R.O. (2007). Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 146, 456–460.
- Jönsson, K.I., Rabbow, E., Shill, R.O., Harms-Ringdahl, M., and Rettberg, P. (2008). Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology* 18, R728.
- Keilin, D. (1959). The Leeuwenhoek Lecture: The Problem of Anabiosis or Latent Life: History and Current Concept. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 150, 149–191.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.
- Kinchin, I. (1994). *The Biology of Tardigrades*. Portland Press.
- Kiontke, K.C., Félix, M.-A., Ailion, M., Rockman, M.V., Braendle, C., Pénigault, J.-B., and Fitch, D.H. (2011). A phylogeny and molecular barcodes for *Caenorhabditis*, with numerous new species from rotting fruits. *BMC Evolutionary Biology* 11, 339.
- Klekowski, R.Z., and Opalinski, K.W. (1989). Oxygen consumption in Tardigrada from Spitsbergen. *Polar Biology* 9, 299–303.
- Koch, D. (2003). Propriétés et utilisations du SF6 dans les appareils MT et HT. *Cahier Technique n°188*. Schneider Electric.
- Kondo, K., Kubo, T., and Kunieda, T. (2015). Suggested Involvement of PP1/PP2A Activity and De Novo Gene Expression in Anhydrobiotic Survival in a Tardigrade, *Hypsibius dujardini*, by Chemical Genetic Approach. *Plos One* 10, e0144803.
- Koutsovoulos, G., Kumar, S., Laetsch, D.R., Stevens, L., Daub, J., Conlon, C., Maroon, H., Thomas, F., Aboobaker, A.A., and Blaxter, M. (2016). No evidence



- for extensive horizontal gene transfer in the genome of the tardigrade *Hypsibius dujardini*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 5053–5058.
- Lipinski, K.J., Farslow, J.C., Fitzpatrick, K.A., Lynch, M., Katju, V., and Bergthorsson, U. (2011). High Spontaneous Rate of Gene Duplication in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 21, 306–310.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annual Review of Genetics* 40, 159–185.
- Luz, A.L., Rooney, J.P., Kubik, L.L., Gonzalez, C.P., Song, D.H., and Meyer, J.N. (2015). Mitochondrial Morphology and Fundamental Parameters of the Mitochondrial Respiratory Chain Are Altered in *Caenorhabditis elegans* Strains Deficient in Mitochondrial Dynamics and Homeostasis Processes. *Plos One* 10, e0130940.
- Maas, A., and Waloszek, D. (2001). Cambrian Derivatives of the Early Arthropod Stem Lineage, Pentastomids, Tardigrades and Lobopodians – An “Orsten” Perspective. *Zoologischer Anziger* 240, 451–459.
- Marcus, E. (1929). Zur embryologie der tardigraden. *Zoologische Jahrbücher* 50, 333–384.
- Marshall, N. (1976). *Encyclopédie des gaz Gas encyclopaedia* translated by Nissim Marshall.
- Maupas, E. (1900). Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 8, 463–624.
- May, R.M., Maria, M., and Guimard, J. (1964). Action différentielle des rayons x et ultraviolets sur le tardigrade *Macrobotus areolatus*, a l'état actif et desséché. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique* 98, 349–367.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16, R551–R560.
- McInnes, S.J. (1994). Zoogeographic distribution of terrestrial/freshwater tardigrades from current literature. *Journal of Natural History* 28, 257–352.
- McInnes, S.J., and Pugh, P.J.A. (1998). Biogeography of Limno-Terrestrial Tardigrada, with Particular Reference to the Antarctic Fauna. *Journal of Biogeography* 25, 31–36.
- Meyer, J.N., Leung, M.C.K., Rooney, J.P., Sandoel, A., Hengartner, M.O., Kisby, G.E., and Bess, A.S. (2013). Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants. *Toxicological Sciences* 134, 1–17.
- Miller, W.R. (2011). Tardigrades. *American Scientist* 99, 384–391.

- Morgan, P.G., Kayser, E.-B., and Sedensky, M.M. (2007). *C. elegans* and volatile anesthetics. In *WormBook*.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R.H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y.-S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., et al. (2013). The NAD<sup>+</sup>/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* 154, 430–441.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Chinwalla, A.T., Cook, L.L., Delehaunty, K.D., Fewell, G.A., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Graves, T.A., Hillier, L.W., Mardis, E.R., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.
- Muller, K.J., Walossek, D., and Zakharov, A. (1995). Orsten type phosphatized soft-integument preservation 718 and a new record from the Middle Cambrian Kuonamka Formation in Siberia. *Neues Jahrbuch Für 719 Geologie Und Paläontologie, Abhandlungen* 197, 101–118.
- Nelson, D.R. (2002). Current status of the Tardigrada: evolution and ecology. *Integrative and Comparative Biology* 42, 652–659.
- Nelson, D.R., and Marley, N.J. (2000). The biology and ecology of lotic Tardigrada. *Freshwater Biology* 44, 93–108.
- Neustadt, J., and Pieczenik, S.R. (2008). Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 780–788.
- Ng, L.F., Gruber, J., Cheah, I.K., Goo, C.K., Cheong, W.F., Shui, G., Sit, K.P., Wenk, M.R., and Halliwell, B. (2014). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 71, 390–401.
- Nicholls, D.G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 38, 311–317.
- Nilsson, E.J., Ingemar Jönsson, K., and Pallon, J. (2010). Tolerance to proton irradiation in the eutardigrade *Richtersius coronifer* – a nuclear microprobe study. *International Journal of Radiation Biology* 86, 420–427.
- Olsen, A., Vantipalli, M.C., and Lithgow, G.J. (2006). Checkpoint Proteins Control Survival of the Postmitotic Cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 312, 1381–1385.
- Ono, F., Saigusa, M., Uozumi, T., Matsushima, Y., Ikeda, H., Saini, N.L., and Yamashita, M. (2008). Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 69, 2297–2300.
- Ono, F., Mori, Y., Sougawa, M., Takarabe, K., Hada, Y., Nishihira, N., Motose, H., Saigusa, M., Matsushima, Y., Yamazaki, D., et al. (2012). Effect of very high

- pressure on life of plants and animals. *Journal of Physics: Conference Series* 377, 12053.
- Ono, F., Mori, Y., Takarabe, K., Fujii, A., Saigusa, M., Matsushima, Y., Yamazaki, D., Ito, E., Galas, S., Saini, N.L., et al. (2016). Effect of ultra-high pressure on small animals, tardigrades and *Artemia*. *Cogent Physics* 3, 1167575.
- Peterson, K.J., and Eernisse, D.J. (2001). Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evolution & Development* 3, 170–205.
- Pigon, A., and Weglarska, B. (1955). Rate of metabolism in tardigrades during Active life and Anabiosis. *Nature* 176, 122–123.
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., and Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. *Journal of Visualized Experiments* 64, e4019.
- Rahm, P.G. (1923). Biologische und physiologische Beiträge zur Kenntnis der Moosfauna. *Zeitschrift F. Allg Physiologie* 20, 1–34.
- Rahm, P.G. (1937). Eine neue Tardigraden-Ordnung aus den heißen Quellen von Unzen, Insel Kyushu, Japan. *Zoologischer Anzeiger* 120, 65–71.
- Ramazzotti, G., and Maucci, W. (1983). Il Phylum Tardigrada. III edizione riveduta e aggiornata. *Memorie dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia* 41, 1–1012.
- Ramløv, H., and Westh, P. (2001). Cryptobiosis in the Eutardigrade *Adorybiotus (Richtersius) coronifer*: Tolerance to Alcohols, Temperature and de novo Protein Synthesis. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 240, 517–523.
- Rebecchi, L., and Bertolani, R. (1988). New Cases of Parthenogenesis and Polyploidy in the Genus *Ramazzottius* (Tardigrada, Hypsibiidae) and a Hypothesis Concerning Their Origin. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 14, 187–196.
- Rebecchi, L., and Nelson, D.R. (1998). Evaluation of a secondary sex character in eutardigrades. *Invertebrate Biology* 117, 194–198.
- Rebecchi, L., Altiero, T., and Guidetti, R. (2007). Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebrate Survival Journal* 4, 65–81.
- Rebecchi, L., Altiero, T., Guidetti, R., Cesari, M., Bertolani, R., Negroni, M., and Rizzo, A.M. (2009). Tardigrade resistance to space effects: first results of experiments on the LIFE-TARSE mission on FOTON-M3 (September 2007). *Astrobiology* 9, 581–591.
- Reuner, A., Hengherr, S., Mali, B., Förster, F., Arndt, D., Reinhardt, R., Dandekar, T., Frohme, M., Brümmer, F., and Schill, R.O. (2010). Stress response in tardigrades:

- differential gene expression of molecular chaperones. *Cell Stress and Chaperones* 15, 423–430.
- Ricci, C., and Pagani, M. (1997). Desiccation of *Panagrolaimus rigidus* (Nematoda): survival, reproduction and the influence on the internal clock. *Hydrobiologia* 347, 1–13.
- Riddle, D.L. (1988). 12 The Dauer Larva. Cold Spring Harbor Monograph Archive 17.
- Rizzo, A.M., Negroni, M., Altiero, T., Montorfano, G., Corsetto, P., Berselli, P., Berra, B., Guidetti, R., and Rebecchi, L. (2010). Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 156, 115–121.
- Rodriguez, M., Snoek, L.B., Riksen, J.A.G., Bevers, R.P., and Kammenga, J.E. (2012). Genetic variation for stress-response hormesis in *C. elegans* lifespan. *Experimental Gerontology* 47, 581–587.
- Savic A.G., Guidetti R., Turi A., Pavicevic A., Giovannini I., Rebecchi L., et al. (2015). Superoxide Anion Radical Production in the Tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*, the First Electron Paramagnetic Resonance Spin-Trapping Study. *Biochem Zool.* 88, 451-454.
- Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1659, 115–120.
- Schokraie, E., Hotz-Wagenblatt, A., Warnken, U., Mali, B., Frohme, M., Förster, F., Dandekar, T., Hengherr, S., Schill, R.O., and Schnölzer, M. (2010). Proteomic Analysis of Tardigrades: Towards a Better Understanding of Molecular Mechanisms by Anhydrobiotic Organisms. *Plos One* 5, e9502.
- Ségalat, L., Grisoni, K., Archer, J., Vargas, C., Bertrand, A., and Anderson, J.E. (2005). CAPON expression in skeletal muscle is regulated by position, repair, NOS activity, and dystrophy. *Experimental Cell Research* 302, 170–179.
- Seki, K., and Toyoshima, M. (1998). Preserving tardigrades under pressure. *Nature* 395, 853–854.
- Shaham, S. (2006). Methods in cell biology. In *WormBook*.
- Speakman, J.R. (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology* 208, 1717–1730.
- Staniland, L.N. (1957). The Swarming of Rhabditid eelworms in mushroom houses. *Plant Pathology* 6, 61–62.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. In *WormBook*.

- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 56, 110–156.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 100, 64–119.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
- Tanaka, S., Tanaka, J., Miwa, Y., Horikawa, D.D., Katayama, T., Arakawa, K., Toyoda, A., Kubo, T., and Kunieda, T. (2015). Novel Mitochondria-Targeted Heat-Soluble Proteins Identified in the Anhydrobiotic Tardigrade Improve Osmotic Tolerance of Human Cells. *Plos One* 10, e0118272.
- Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics* 6, 389–402.
- Tenlen, J.R., McCaskill, S., and Goldstein, B. (2013). RNA interference can be used to disrupt gene function in tardigrades. *Development Genes and Evolution* 223, 171–181.
- Théoleyre, S. (1999). Techniques de coupure en moyenne tension. Cahier Technique n°193. Schneider Electric.
- Tsujimoto, M., Imura, S., and Kanda, H. (2016). Recovery and reproduction of an Antarctic tardigrade retrieved from a moss sample frozen for over 30 years. *Cryobiology* 72, 78–81.
- Ventura, N., Rea, S.L., and Testi, R. (2006). Long-lived *C. elegans* Mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. *Experimental Gerontology* 41, 974–991.
- Von Erlanger, R. (1895). Beiträge zur Morphologie der Tardigraden: I. Zur Embryologie eines Tardigraden: *Macrobiotus macronyx* Dujardin. *Morphol Jahrb* 22, 491–513.
- Von Wenck, W. (1914). Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Tardigraden (*Macrobiotus lacustris* Duj.). *Zoologische Jahrbücher* 37, 465–514.
- Walz, B. (1982). Molting in Tardigrada. A review including new results on cuticle formation in *Macrobiotus hufelandi*. (Johnson City, Tennessee: D. R. Nelson (ed.)), pp. 129–147.
- Ward, S., and Carrel, J. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 73, 304–321.

- Westh, P., and Ramløv, H. (1991). Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology* 258, 303–311.
- Wiederhofs, H., and Greven, H. (1996). The cerebral ganglia of *Milnesium tardigradum* Doyère (Apochele, Tardigrada): Three dimensional reconstruction and notes on their ultrastructure. *Zoological Journal of the Linnean Society* 116, 71–84.
- Wolkow, C.A., and Hall, D.H. (2011). The dauer cuticle. In *WormAtlas*.
- Wong, A., Boutis, P., and Hekimi, S. (1995). Mutations in the *clk-1* Gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 139, 1247–1259.
- Wright, J.C. (1989). Desiccation tolerance and water-retentive mechanisms in tardigrades. *Journal of Experimental Biology* 142, 267–292.
- Wright, J.C. (2001). Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? *Zoologischer Anzeiger* 240, 563–582.
- Wright, E.L., Meyer, S.S., Bennett, C.L., and Wilkinson, D.T. (1992). Interpretation of the cosmic microwave background radiation anisotropy detected by the COBE differential microwave radiometer. *The Astrophysical Journal* 396, L13–L18.
- Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., Imajoh-Ohmi, S., Horikawa, D.D., Toyoda, A., Katayama, T., Arakawa, K., et al. (2012). Two Novel Heat-Soluble Protein Families Abundantly Expressed in an Anhydrobiotic Tardigrade. *Plos One* 7, e44209.
- Zimmermann, A., Bauer, M.A., Kroemer, G., Madeo, F., and Carmona-Gutierrez, D. (2014). When less is more: hormesis against stress and disease. *Microbial Cell* 1, 150–153.

# ***ANNEXES***

## ANNEXE A

### PROTOCOLE DE PREPARATION DES ŒUFS DE *C. ELEGANS* (DECONTAMINATION/SYNCHRONISATION)

*Le présent document décrit le procédé de préparation des œufs de *C. elegans* permettant leur décontamination massive et/ou la synchronisation des cultures.*

#### I. Réactifs et matériels nécessaires

##### A. Réactifs

- Boîtes NGM agar contenant des nématodes
- Boîtes NGM agar avec culture de *E. coli* HT115(DE3)
- Milieu M9
- Milieu S-base
- Javel
- NaOH 5M

##### B. Matériels

- Tubes Falcon 15 ml
- Centrifugeuse
- Pipette
- Pompe à vide

#### II. Protocole

##### A. Préparation du Milieu M9

- ✓ Dans un flacon d'1 litre, mélanger :

Composé	Quantité (poids ou volume)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
Eau osmosée	qsp 1 l

- ✓ Autoclavage



## B. Préparation du milieu S-base

- ✓ Dans un flacon d'1 litre, mélanger :

Composé	Quantité (poids ou volume)
NaCl	5,9 g
Phosphate de Potassium 1M pH6	50 ml
Eau osmosée	qsp 1 l

- ✓ Autoclavage
- ✓ Ajout d'1 ml de Cholestérol (5 mg/ml dans EtOH) quand la température du milieu est d'environ 55°C.

## C. Protocole de bleaching

- Recueillir les animaux à partir de boîtes NGM-Agar dans un tube Falcon 15 ml (en plusieurs fois) avec 7 ml de milieu M9.
- Centrifuger 3 minutes à 1600 rpm : on obtient un culot de vers et les bactéries restent dans le surnageant.  
Attention à ne pas centrifuger trop fort pour ne pas faire sédimenter les bactéries!
- Oter le surnageant à l'aide de la pompe à vide et laver deux fois avec 5 ml de milieu M9 pour enlever toutes les bactéries.
- Suspendre le culot de nématodes dans 3,5 ml de milieu M9 et homogénéiser.
- Ajouter 0,5 ml de NaOH puis 1 ml de Javel.
- Laisser agir 3 minutes en faisant de temps en temps des allers-retours.
- Centrifuger à 1600 rpm pendant 2 minutes afin d'enlever le NaOH et la javel.
- Oter le surnageant et laver deux fois avec 5 ml de milieu M9.
- Après le dernier lavage, suspendre le culot de nématodes dans du milieu S-base et transférer dans plusieurs boîtes NGM-Agar contenant des bactéries *E. coli* HT115.
- Laisser éclore les œufs et atteindre le stade choisi.

**ANNEXE B**  
**COMPOSITION DES MILIEUX CHALKLEY ET BOLD BASAL**

**Composition du milieu Chalkley pour 1 litre**

Préparation de 3 solutions stocks dans 100 ml d'eau distillée

1	2.0 g NaCl
2	0.08 g KCl
3	0.12 g CaCl <sub>2</sub>

Préparation du milieu Chalkley

Composé	Quantité
Solution stock 1	5 ml
Solution stock 2	5 ml
Solution stock 3	5 ml
Extrait de sol	20 ml
Eau	qsp 1 l

## Composition du milieu Bold Basal pour 1 litre

### Préparation de solutions stocks

Dans 400 ml d'eau distillée	1	10.0 g NaNO <sub>3</sub>
	2	3.0 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
	3	1.0 g NaCl
	4	3.0 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	5	7.0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	6	1.0 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
Dans 1 l d'eau distillée	7	8.82g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O + 1.44g MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O + 0.71g MoO <sub>3</sub> + 1.57 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O + 0.49 g CoNO <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O
	8	11.42g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	9	EDTA-KOH Solution : EDTA 50.0g KOH 31.0g
	10	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 4.98g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc) 1.0ml

### Préparation du milieu Bold Basal

Composé	Quantité
Solution stock 1 à 6	10 ml
Solution stock 7 à 10	1 ml
Extrait de sol	250 ml
Eau	qsp 1 l

***PORTEFEUILLE DE COMPETENCES ET  
VALORISATION SCIENTIFIQUE DE LA  
THESE***

## **Congrès et séminaires**

- 21<sup>ème</sup> Journée Jeunes Chercheurs / Société de Chimie Thérapeutique - 2014 - Montpellier, France.
- 5<sup>ème</sup> Journée Montpelliéraine de Toxicologie d'Urgence - 2014 - Montpellier, France.
- 31<sup>ème</sup> congrès International de la Société de Pharmacie de la Méditerranée Latine : "Le Pharmacien au service du patient cancéreux" - 2014 - Montpellier, France.
- 1<sup>st</sup> International Symposium "Mechanisms Underlying Memory Storage and Pathological Learning" - 2015 - Montpellier, France.
- Workshop "Functional genetic screening in cancer cells" - 2015 - Montpellier, France.
- 13<sup>th</sup> International Symposium on Tardigrada - 2015 - Modena, Italie.
- Rencontre Scientifique "Chimistes Biologistes et Cliniciens contre le Cancer" - 2016 - Montpellier, France.
- Congrès Biotrace - 2016 - Montpellier, France.

## **Journées Doctorales**

- Journée CBS2 2014 - Montpellier, France.
- Journée CBS2 2015 - Montpellier, France.
- Journée CBS2 2016 - Montpellier, France.

## **Formations**

### *Générale*

- Cérémonie d'accueil des nouveaux inscrits de l'ED CBS2

### *Outil pour la poursuite de carrière*

- Développer une meilleure confiance en soi - 14 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon
- La thèse dans le cadre d'un projet professionnel - 8 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon

### *Méthodologie et outils de la thèse*

- Recherche et gestion de l'information : méthodes, outils, ressources en Santé/Sciences - 14 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon
- Rédiger et exposer ses travaux de thèses - 6 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon
- Dépôt électronique de la thèse : présentation générale et aspects juridiques - 3 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon
- Le management qualité : un outil au service de la recherche - 12 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon

### *Entrepreneuriat*

- Auto entrepreneur - 3 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon

- Les ONG, Associations Comment les aborder? - 3 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon
- Préparer votre comptabilité - 11 heures - Chambre de Métiers et de l'Artisanat de l'Hérault

### *Enseignement*

- Initiation aux outils pédagogiques pour l'enseignement universitaire - 20 heures - Collège Doctoral Languedoc Roussillon

## **Enseignements**

### **2014 :**

- Participation aux TP de Toxicologie Moléculaire - 2ème année Pharmacie : 60 heures.
- Encadrement d'une étudiante de Master 2 « Ingénierie de la Santé - Pharmacogénomique du vieillissement » Elige CHBAT durant ses 6 mois de stage.  
Sujet : Identification des cibles de l'acide chicorique dans les voies de la longévité.
- Encadrement d'une étudiante, Véra MARTENS, de la faculté de Pharmacie de l'Université de Heidelberg pour son stage ERASMUS « Practical lab training » durant 3 mois.

### **2015 :**

- Participation aux TP de Toxicologie Moléculaire - 2ème année Pharmacie : 60 heures.
- Encadrement d'un étudiant de Master 2 « Biomed - Contrôle du déterminisme cellulaire et cancer » Sébastien LABELLE durant ses 6 mois de stage.  
Sujet : Evaluation de l'impact physiologique de traitements chimiques solubles sur la viabilité et le vieillissement chez *Caenorhabditis elegans*.

### **2016 :**


- Mise en place d'un TP sur le modèle *Caenorhabditis elegans* pour des étudiants en 3<sup>ème</sup> année de Pharmacie dans le cadre de l'UE Pharmacologie, Physiologie et Toxicologie expérimentales : « Démonstration de modèles alternatifs utilisés en toxicologie (nématodes, HET-CAM) » : 3 heures.
- Mise en place d'un TP sur le modèle *Caenorhabditis elegans* pour les Master 1 Sciences du Médicament - Parcours Aging et stratégies anti-âge : 6 heures.
- Encadrement d'une étudiante de Master 2 « Sciences du Médicament Parcours Aging et stratégies anti-âge » Maelys GARNIER durant ses 6 mois de stage.  
Sujet : Etude du plancton et de l'eau thermale de Mollitg-les-bains sur modèle cellulaire et *C. elegans*.
- Encadrement d'une étudiante de Master 2 « Diagnostic et Traçabilité des Environnements Chimiques et Biologiques » Leila CHOUIT durant ses 5 mois de stage.  
Sujet : Etude de la tolérance subaiguë chez *Caenorhabditis elegans* de gaz à utilisation industrielle.

## Posters


- Richaud M., Attaoua C., Cuq P., and Galas S. 2014. A new integrated platform for drug action mode determination in *C. elegans*. 21èmes Journées des Jeunes Chercheurs SCT. Montpellier, France.
- Richaud M., Cuq P., and Galas S. 2015. Integrated models for assessment of significant biological mechanisms in oncopharmacology and aging: *C. elegans* and *H. dujardini*. Journée CBS2 2015. Montpellier, France.
- Richaud M., Cuq P., and Galas S. 2015. Energetic status control of the Tardigrade *Hypsibius dujardini* anhydrobiotic state. 13<sup>th</sup> International Symposium on Tardigrada. Modena, Italie.
- Richaud M., Cuq P., and Galas S. 2015. Integrated models for assessment of significant biological mechanisms in oncopharmacology and aging: *C. elegans* and *H. dujardini*. Journée CBS2 2016. Montpellier, France.

## Articles

Richaud M., Perrin A., Bailly A., Cuq P. and Galas S. 2016. Mitochondria dynamics and anhydrobiosis of the Tardigrade *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840). Article soumis dans PLoS One (PONE-D-16-39523).



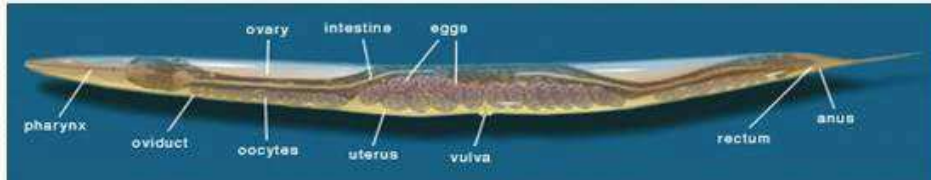
**IBMM**  
Institut des  
Biomolécules  
Max Mousseron

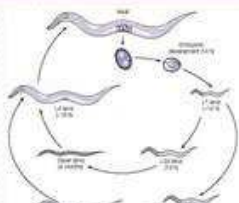


**POLE**  
chimie  
Balard

## A new integrated platform for drug action mode determination in *C. elegans*

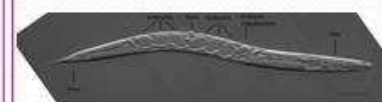
Myriam Richaud, Chaker Attaoua, Pierre Cuq and Simon Galas  
Laboratoire de Toxicologie, Institut de Pharmacie, 35, Av. Charles Flahault 34 091, 34095 Montpellier cedex 5






The developmental life cycle of the worm *Caenorhabditis elegans* resume in 4 larval stage and span roughly 3 days at 20° C. Embryonic development belong to mosaic scheme. Life span expectancy are 2-3 weeks.

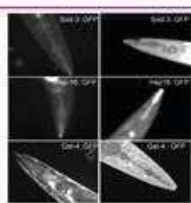
*C. elegans* worms are composed of 959 cells at the adult stage (self-fertilizing hermaphrodite). Adult hermaphrodite are 3mm length and 60um diameter. All of the cells are well identified and invariable in number and position between individuals.





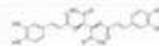
Worm population can be maintained in classical petri dishes seeded with bacteria (the right picture show worm head filled with GFP expressing *E. coli*) as well as on ELISA plates filled with liquid media or insoluble molecules embedded into agar cushion.

One *C. elegans* wild type hermaphrodite can lay up to 280 embryos at the approximate rate of 9 per hour at 20° C.



Numerous transgenes can be retrieved in *C. elegans* to assess for molecular response to a given molecule or treatment in course of aging as well. From the top to the bottom right are presented transgene expression for Manganese superoxide dismutase-3, heat shock protein and Glutathion-S-transferase.

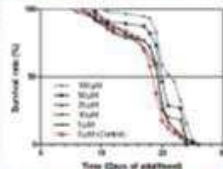
**EXAMPLE # 1:** Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP Kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *C. elegans*. (2012 collaboration with Institut des Biomolécules Max Mousseron-IBMM-UMR 5247 CMSE)



Polyphenolic molecules such metformin, resveratrol, quercetin or epigallocatechingallate were found to activate AMPK (AMPK) have antiobesity properties and prolong lifespan, mimicking the effects of food restriction or exercise. Our collaborative laboratory identified the Chicoric acid that belong to caffeoyl polyphenolic molecules (e.g. caffeic acid and chlorogenic acid) and shown to display *in vitro* and *in vivo* antiobesity properties by acting on various, but mainly, unidentified cellular and molecular targets. The Insulin/Igf1 regulatory pathway control the *C. elegans* aging and stress resistance. The *C. elegans* lifespan is regulated by AMPK/ATP ratio where AMP activated kinase act as a "energy sensor" (Apfeld et al. 2004). Numerous tools are already available.

Does Chicoric acid modulate lifespan of *C. elegans* ?

**RESULTS # 1:** Chicoric acid impact on *C. elegans* lifespan. Wild type (N2) *C. elegans* worm lifespan analysis was performed at 20° C on ELISA 96 plates at various Chicoric acid concentrations as indicated.




19% lifespan augmentation upon 100uM Chicoric acid treatment while *ask-2* overexpression account for 13% lifespan augmentation only (Apfeld J. et al., 2004).

**RESULTS # 2:** status of the Chicoric acid molecule: target ? *ask-2* knockdown by RNAi feeding.

*C. elegans ask-2* gene encodes for the catalytic subunit of the AMP-activated kinase in *C. elegans* that is 55% identical to Human Alpha-Hu AMP-activated kinase.


Strategy: *ask-2* knockdown by RNAi feeding.



*ask-2* knockdown by RNAi feeding impairs significantly stress resistance in *C. elegans*.

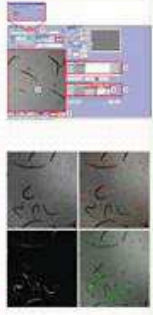
**Publication in press:** Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP Kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Schlennitzauer et al., Plos One, 2013.

**EXAMPLE # 2:** Vinca-Alcaloids and new molecule targets determination by using acquired resistance screens and HCS analysis on a ArrayScan VTI.







We adapted worm culture to ELISA standard in order to be compatible with various fluorescent transgenes induction in a Cellomics Arrayscan VTI Content Screenings in Big Pharma industry. This device allow High Content Screenings.


**EXAMPLE # 2:** The ArrayScan dedicated software of Cellomics ArrayScan VTI has been adapted to worm shape, thickness and refringence for automated detection.





This picture depict automated process analysis by the Cellomics device: *ask-2* GFP transgene worm population submitted to oxidative treatment (top left) to be analysed automated worm shape recognition by the software (top right) / FIT channel for transgene induction measurement (bottom left) and overlay picture (bottom right).





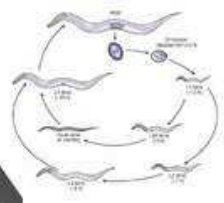
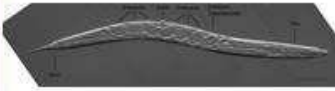
## Integrated models for assessment of significant biological mechanisms in oncoparmacology and aging : *C. elegans* and *H. dujardini*.


**Myriam Richaud, Pierre Cuq and Simon Galas**  
 Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 15, Av. Charles Flahaut BP 14 481, 34093 Montpellier Cedex 5

### Caenorhabditis elegans


The developmental life cycle of the worm *Caenorhabditis elegans* span only 3 days at 20° C. Embryonic development belong to mosaic scheme. Life span expectancy is 2-3 weeks.

*C. elegans* worms are composed of 995 cells at the adult stage (self-fertilizing hermaphrodite). Adult hermaphrodite is 1mm length and 60µm diameter.



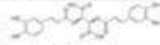
Worm population can be maintained in classical petri dishes seeded with bacteria as well as on EUSA plates filled with liquid media or insoluble molecules embedded into agar cushion.



Numerous mutants can be retrieved in *C. elegans* to assess for molecular response to a given molecule or treatment in course of aging as well.

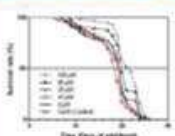
**PROJECT 1 : Chlonic acid**

It is an antioxidant molecule that stimulates AMP Kinase pathway in 48 myotubes and extends lifespan in *C. elegans*. (Schlemminger et al. PLoS ONE 2013;8(11):e78798. doi:10.1371/journal.pone.0078798).



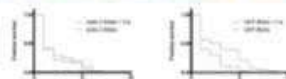
Our collaborative laboratory identified the Chlonic acid that belongs to catechol polyphenolic molecules and shown to display in vitro and in vivo antidiabetic properties by acting on various, but mainly, unidentified cellular and molecular targets. The insulin/IIGF1 regulatory pathway control the *C. elegans* aging and stress resistance. The *C. elegans* lifespan is regulated by AMP/ATP ratio where AMP activated kinase act as a "energy sensor" (Apfeld et al. 2004 - Nucleic Acids Res already available).

Does Chlonic acid modulate lifespan of *C. elegans*?




Wild type (N2) *C. elegans* worm lifespan analysis was performed at 20° C on EUSA 96 plates at various Chlonic acid concentrations. We have obtained 18% lifespan augmentation upon 100µM Chlonic acid treatment while *ask-2* overexpression account for 13% lifespan augmentation only (Apfeld, et al. 2004).

*ask-2* knockdown by RNAi feeding impairs significantly  $\gamma$  stress resistance in *C. elegans*.



### Hypsibius dujardini




*Hypsibius dujardini* hold exceptional characteristics that enable it to withstand high pressure as well as space vacuum or radiation levels that are generally fatal for living organisms.

Similarly to the worm, *H. dujardini* can adopt a resistance state when conditions become harsh. The peculiarity of the latter is to present a specific desiccated state of resistance called anhydrobiosis. Beside this stage, physiological and biochemical modifications have been described. However, lots of data about the molecular and physiological mechanisms that can be accounted for the Tardigrade anhydrobiotic stage resistance are still missing. To date, any detectable metabolic activity of anhydrobiotic Tardigrade species have been uncovered. But what might be the energetic status of the anhydrobiotic Tardigrade as well as endogenous produced oxygen reactive species normally produced by active mitochondria?

We have adapted new techniques for living Tardigrade to uncover mitochondria adaptation and control during metabolic activity shutdown of the anhydrobiotic state.

**PROJECT 1 : O<sub>2</sub> and Bioenergetic**

To check the mitochondria function and energetic status in both living and anhydrobiotic tardigrade, we used a Seahorse device. Respiration measurements have been done on 100 Tardigrades either fed by *Chlorella* sp. algae as a food source or starved.



We have measured a total O<sub>2</sub> consumption up to 2.07 pmol·min<sup>-1</sup>·tardigrade<sup>-1</sup> for fed animals whereas the observed respiration of starved animals range between 0.16 - 0.65 pmol·min<sup>-1</sup>·tardigrade<sup>-1</sup>. Our measurements of the Tardigrade O<sub>2</sub> consumption value 2.07 pmol·min<sup>-1</sup>·tardigrade<sup>-1</sup> is probably underestimated because of *Chlorella* sp. presence in the media believed to permanently release O<sub>2</sub>.

In comparison, a classical O<sub>2</sub> consumption for the worm *C. elegans* in equivalent experimental setup is up to 20 pmol·min<sup>-1</sup>·worm<sup>-1</sup>. Moreover, it appears clearly that O<sub>2</sub> consumption by Tardigrade can increase up to tenfold in the presence of food meaning a fast and direct link between activity and respiration state.

The next step in our Tardigrade bioenergetic assessments will evaluate O<sub>2</sub> consumption time lapse during anhydrobiotic state exit as well as metabolic measures of developing animals.

**PROJECT 2 : Gas test**

Some gas need to be tested in term of toxicity, development, fertility and mutagenicity for an industrial use. To do so, several gas were tested in our laboratory.

Wild type (N2) *C. elegans* worms were exposed during 4 hours to different gas and different concentrations. The toxicity was evaluated at the reactor exit. 50 worms were isolated in petri dishes. Their progeny was studied in term of total number, male number and phenotype.

Results are presented in the following picture:

	O <sub>2</sub> 20%		O <sub>2</sub>		O <sub>2</sub> 20%		O <sub>2</sub> 20%		O <sub>2</sub> 20%		O <sub>2</sub> 20%	
	100.00 µppm	100.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm	10.00 µppm
Survival (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Offspring	0.00	0.00 (0.00%)	0.00	0.00 (0.00%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)	420 (0.80%)
Phenotype	Low Starvation	High Starvation	Low Starvation	High Starvation	Low Starvation	High Starvation	Low Starvation	High Starvation	Low Starvation	High Starvation	Low Starvation	High Starvation

This work shows that the *C. elegans* model is a good and easy way to evaluate physiological effects of treatment on the organism.

**PROJECT 2 : Anhydrobiosis and Tardigrade mitochondria**

To address questions about the mitochondria control level on Tardigrade anhydrobiotic entry and recovery state, we first assessed treatments that target mitochondria electron transport chain components that lie between the complex III and IV: the Cytochrome C. 30 Tardigrades were incubated at the indicated times with sodium nitrite (Na-NO<sub>2</sub>) at the indicated concentrations and assessed for anesthetic effect or wake up.

**Anesthetic effect**



**Wake up**



These experiments indicate a better anesthesia and recovery of Tardigrades upon 4mM Na-NO<sub>2</sub> treatment. On the basis of this experiment, we intend to perform new treatments with mitochondria targeting drugs to assess tardigrade anhydrobiotic stage entry, sensibility and recovery.

# Energetic status control of the Tardigrade *Hypsibius dujardini* anhydrobiotic state.

Myriam Richaud, Pierre Cuq and Simon Galas  
simon.galas@univ-montp1.fr

Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie  
Université de Montpellier, 15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5

Evolutionarily close to the worm *Caenorhabditis elegans* (Phylum Nematoda) and the fruitfly *Drosophila melanogaster* (Phylum Arthropoda), the tardigrade *Hypsibius dujardini* (Phylum Tardigrada), also believed as the "water bear" (Figure 1), hold exceptional characteristics that enable it to withstand high pressure up to 7.5 GPa (= 74020 atm = 75000 bar) as well as space vacuum or radiation levels that are generally fatal for living organisms. The Tardigrade *H. dujardini* is able not merely to resist but also to repair biological damage he suffered with any impact on subsequent life span expectancy.

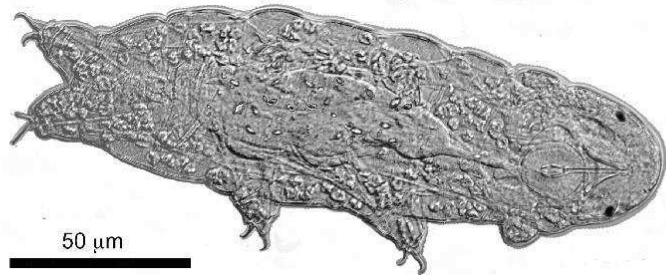


Figure 1: Differential interference contrast (DIC) image showing the morphology of a *H. dujardini* adult.

Similarly to the worm, *H. dujardini* can adopt a resistance state when conditions became harsh. However, the peculiarity of the latter is to present a specific desiccated state of resistance called anhydrobiosis. Beside this specific desiccated stage, where "tardigrade adopt a characteristic "tuna" shape, physiological and biochemical modifications have been described. However, lots of data about the molecular and physiological mechanisms that can be accounted for the Tardigrade anhydrobiotic stage resistance are still missing. To date, any detectable metabolic activity of anhydrobiotic Tardigrade species have been uncovered. But what might be the energetic status of the anhydrobiotic Tardigrade as well as endogenous produced oxygen reactive species normally produced by active mitochondria?

We have adapted new techniques for living Tardigrade to uncover mitochondria adaptation and control during metabolic activity shutdown of the anhydrobiotic state.

Figure 2: Differential interference contrast (DIC) image showing the morphology of a *Chlorococcum* sp. for *H. dujardini* supply.

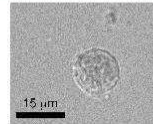


Figure 3: A Seahorse apparatus for bioenergetics measures of living Tardigrades.

## O<sub>2</sub> and Bioenergetics.

**Background:** To check out for the mitochondria function and energetic status in both living and anhydrobiotic tardigrade, we used a Seahorse device (Figure 3). Seahorse can be used on cellular bioenergetics by assessing the cellular O<sub>2</sub> consumption (respiration), the proton excretion (glycolysis) and the fatty acid oxidation level (anaerobic metabolism). Respiration measurements have been done on 100 Tardigrades either feeded by *Chlorococcum* sp. algae as a food source (Figure 2) or starved. Figure 4 shows a classical OCR (Oxygen Consumption Rate) for Tardigrade in the presence and absence of food. We have measured a total O<sub>2</sub> consumption up to 2.07 pmol min<sup>-1</sup> tardigrade<sup>-1</sup> for feeded animals whereas the observed respiration of starved animals range between 0.16 - 0.83 pmol min<sup>-1</sup> tardigrade<sup>-1</sup>.

**More forward:** Our measurement of the Tardigrade O<sub>2</sub> consumption value 2.07 pmol min<sup>-1</sup> tardigrade<sup>-1</sup> is probably underestimated because of *Chlorococcum* sp. presence in the media believed to permanently release O<sub>2</sub>. In comparison, a classical O<sub>2</sub> consumption for the worm *C. elegans* in equivalent experimental setup is up to 20 pmol min<sup>-1</sup> worm<sup>-1</sup>. Moreover, it appears clearly that O<sub>2</sub> consumption by Tardigrade can increase up to ten fold in the presence of food meaning a fast and direct link between activity and respiration state. The next step in our Tardigrade bioenergetics assessments will evaluate O<sub>2</sub> consumption time lapse during anhydrobiotic state exit as well as metabolic measures of developing animals.

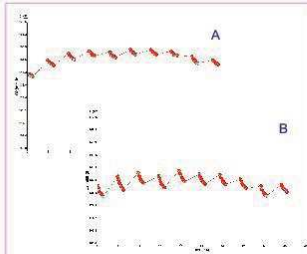


Figure 4: OCR (oxygen consumption rate) for 100 Tardigrade either in the presence (A) or absence (B) of food (*Chlorococcum* sp.).

## Anhydrobiosis and Tardigrade mitochondria.

**Background:** Mitochondria (Figure 5), main cell energy source, are unfortunately believed as major metabolism by-products generators such reactive oxygen species (ROS). The ROS are responsible for macromolecular and cell protein attacks by oxidation and carbonylation that can, in turn, limit stress resistance and lifespan expectancy when a molecular crisis threshold has been reached.

To address questions about mitochondria control level on anhydrobiotic entry and recovery, we first assessed treatments that target mitochondria electron transport chain components that lie between the complex III and IV: the Cytochrome C.

To do so, 30 Tardigrades were incubated at the indicated times with sodium azide (NaN<sub>3</sub>) at the indicated concentrations, and assessed for anesthetic effect (Figure 6a) or wake up (Figure 6b).

### More forward:

These experiments indicate a better anaesthesia and recovery of Tardigrades upon 4 mM NaN<sub>3</sub> treatment, while greater concentration appears more toxic. On the basis of this experiment, we intend to target others electron transport chain components to assess for Tardigrade anhydrobiotic stage entry, sensibility and recovery mechanisms.



Figure 5: A mitochondria inside a cell where energy (mainly ATP) is produced.

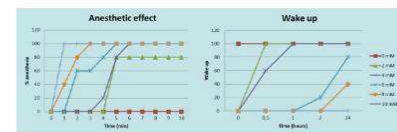


Figure 6: Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) effect on Tardigrades.

## Living Tardigrade superoxide production during anhydrobiosis.

**Background:** Endogenous productions of reactive oxygen species are believed to directly depend on metabolism level. Because anhydrobiotic Tardigrades are supposed devoid of any metabolic activity, it is possible that superoxide anion remnants exists because of unknown sources.

To check out for mitochondria dyes we performed *C. elegans* staining (Figure 7A) with MitoTracker Red and revealed the expected mitochondria pattern. We then used MitoTracker Green and Red staining on Tardigrades as shown on Figure 7B.

### More forward:

This first attempt to reveal Tardigrade mitochondria pattern is in progress in order to identify, on living Tardigrade, the membrane potential changes and superoxide production.

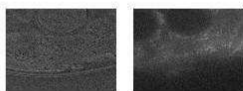


Figure 7A: DIC photomicrograph (left) and epifluorescence (right) of a *C. elegans* adult showing a mitochondria network (MitoTracker Red staining).

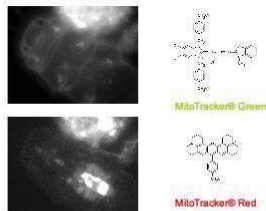
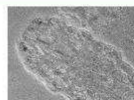




Figure 7B: DIC photomicrograph (upper), MitoTracker Green and MitoTracker red staining showing various staining patterns in a living Tardigrade.

## Conclusions

Recent molecular analysis of genome yielded comparable results than the one of both worm and fruitfly. However, *H. dujardini* genome operate quite differently because allowing Tardigrades to cope with extreme environments. By using innovative tool combinations, we propose an integrated study to bring to light the specific molecular mechanisms that allow such extreme adaptation. On this basis, we expect to perform further gene knockouts to decipher molecular and biochemical keys pathways involved in cryptobiosis/anhydrobiosis installation and recovery programs.



**IBMM**  
Institut des  
Biomolécules  
Max Mousseron





POLE  
chimie  
Balard

## Integrated models for assessment of significant biological mechanisms in oncopharmacology and aging : *C. elegans* and *H. dujardini*.

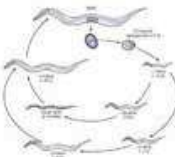
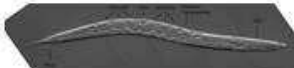
**Myriam Richaud, Pierre Cuq and Simon Galas**

IBMM UMR 5247 - Laboratoire de Toxicologie du Médicament - UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques - Université de Montpellier  
15 avenue Charles Flahault - BP14401 - 34093 Montpellier Cedex 3





### Caenorhabditis elegans


The developmental life cycle of the worm *Caenorhabditis elegans* span only 3 days at 20° C. Embryonic development belong to mosaic scheme. Life span expectancy is 2-3 weeks.

*C. elegans* worms are composed of 959 cells at the adult stage (self-fertilizing hermaphrodite). Adult hermaphrodite is 1mm length and 60µm diameter.



Worm population can be maintained in classical petri dishes seeded with bacteria as well as on ELISA plates filled with liquid media or insoluble molecules embedded into agar cushion.



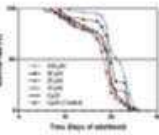
Numerous mutants can be retrieved in *C. elegans* to assess for molecular response to a given molecule or treatment in course of aging as well.

---

#### PROJECT 1 : Treatment test – Example of Chicoric acid


Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMPK pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *C. elegans*. (Schlennitzauer et al. PLoS ONE 2013;8(11):e78788. doi:10.1371/journal.pone.0078788).

Does Chicoric acid modulate lifespan of *C. elegans*?



Wild type (N2) *C. elegans* worm lifespan analysis was performed at 20° C on ELISA 96 plates at various Chicoric acid concentrations. We have obtained 19% lifespan augmentation upon 100µM Chicoric acid treatment while *sak-2* overexpression account for 13% lifespan augmentation only (Apfeld J. et al., 2004).

*sak-2* Knockdown by RNAi feeding impairs significantly T<sup>1</sup> stress resistance in *C. elegans*




---

#### PROJECT 2 : Gas test

Some gas need to be tested in term of toxicity, development, fertility and mutagenicity for an industrial use. To do so, several gas were tested in our laboratory for industrial R&D problems.

Wild type (N2) *C. elegans* worms were exposed during 4 hours to different gas at different concentrations. The toxicity was evaluated at the reactor exit. 50 worms were isolated in petri dishes. Their progeny was studied in term of total number, male number and phenotype. Results are presented in the following picture :

Species	200 ppm		2000 ppm		20000 ppm		200000 ppm		Total progeny of 4 weeks
	Survival	Progeny	Survival	Progeny	Survival	Progeny	Survival	Progeny	
<i>C. elegans</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>H. dujardini</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

---


#### PROJECT 3 : Water test

Some waters need to be tested for there anti-aging effect for an industrial use. To do so, these waters were tested in term of lifespan compared to there standard medium.

These works shows that the *C. elegans* model is a model for the evaluation of physiological effects of molecules and versatile treatment.

### Hypsibius dujardini

*Hypsibius dujardini* hold exceptional characteristics that enable it to withstand high pressure as well as space vacuum or radiation levels that are generally fatal for living organisms. This tardigrade is able not merely to resist but also to repair biological damage he suffered with any impact on subsequent life span expectancy.




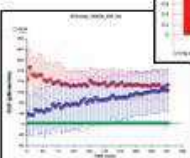
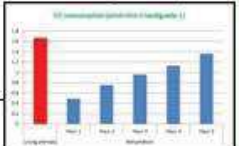
Similarly to the worm, *H. dujardini* can adopt a resistance state when conditions become harsh. The peculiarity of the latter is to present a specific desiccated state of resistance called anhydrobiosis. Beside this stage, physiological and biochemical modifications have been described. However, lots of data about the molecular and physiological mechanisms that can be accounted for the Tardigrade anhydrobiotic stage resistance are still missing. To date, any detectable metabolic activity of anhydrobiotic Tardigrade species have been uncovered. We have adapted new techniques for living Tardigrade to uncover mitochondria adaptation and control during metabolic activity shutdown of the anhydrobiotic state.

---

#### O<sub>2</sub> and Bioenergetics

To check the mitochondria function and energetic status in both living and anhydrobiotic tardigrade, we used a Seahorse device.

Respiration measurements have been done on 100 living tardigrades and 100 tardigrades during anhydrobiotic state exit.

We have measured a total O<sub>2</sub> consumption up to 1.6 pmol min<sup>-1</sup> tardigrade<sup>-1</sup> for living animals whereas the observed respiration of anhydrobiotic animals increase between 0.5 pmol min<sup>-1</sup> tardigrade<sup>-1</sup> after 30 minutes and 1.4 pmol min<sup>-1</sup> tardigrade<sup>-1</sup> after 5 hours of rehydration.

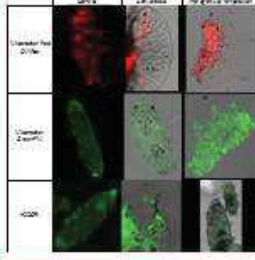
It appears clearly that O<sub>2</sub> consumption by Tardigrade can increase rapidly after rehydration. This time lapse shows a fast and direct link between activity and respiration state.


---




#### Anhydrobiosis and Tardigrade mitochondria

Mitochondria, main cell energy source, are unfortunately believed as major metabolism by-products generators such reactive oxygen species (ROS). The ROS are responsible for macromolecular and cell protein attacks by oxidation and carbonylation that can, in turn, limit stress resistance and lifespan expectancy when a molecular crisis threshold has been reached.

To address questions about mitochondria control level on anhydrobiosis entry and recovery, we tested several mitotrakers (MitoTracker® Red CMXRos - MitoTracker® Green FM - H2DCFDA (H2-DCF, DCF)) in the three states : control, dehydrated and in the process of rehydration.





191

## Modèles intégrés de mécanistique et de résistance en oncopharmacologie-sénescence : *C. elegans* et *H. dujardini*.

### Résumé :

Comprendre les mécanismes de sénescence ou développer de nouveaux anti-cancéreux impose d'utiliser des modèles biologiques divers et complémentaires. De par sa facilité de mise en œuvre, la culture cellulaire est une des méthodes les plus employées. Cependant, travailler sur des cellules isolées ne permet pas toujours d'extrapoler les résultats à des conditions plus complexes comme un organisme entier. Les biologistes disposent alors de modèles intégrés plus ou moins évolués : levures, poissons (zebrafish ...), grenouille (xénope ...), insectes (drosophile ...), rongeurs (souris, rats ...), chien, primates, etc. Cependant leur mise en œuvre est souvent difficile, tant d'un point de vue administratif que technologique.

L'objectif de notre travail a été d'initier le développement de deux nouveaux modèles biologiques intégrés (*Caenorhabditis elegans* et *Hypsibius dujardini*), beaucoup plus facilement manipulables, pour des études en oncopharmacologie et sénescence.

Le potentiel de *Caenorhabditis elegans* a été évalué au travers de deux axes : (i) nous avons utilisé le nématode pour déterminer les potentiels toxiques, mutagènes et cancérogènes de gaz candidats au remplacement du gaz SF6 (ii) à l'aide du Seahorse XF24 Analyzer, nous avons mis au point un test fonctionnel original : la mesure de la respiration mitochondriale du nématode entier.

Nous avons choisi de développer comme second modèle, *Hypsibius dujardini*, beaucoup moins travaillé que *C. elegans*. C'est un tardigrade connu pour sa résistance aux conditions extrêmes, notamment à la dessiccation. Afin de mieux comprendre cette résistance, nous avons choisi d'analyser le fonctionnement mitochondrial de cet organisme en sortie d'anhydrobiose, en utilisant des marquages mitochondriaux et en mesurant sa respiration à l'aide du Seahorse XF24 Analyzer.

**Mots clés :** Oncopharmacologie, Sénescence, Résistance, Génétique, *Caenorhabditis elegans*, *Hypsibius dujardini*

## Integrated models for assessment of significant biological resistance mechanisms in oncopharmacology and aging: *C. elegans* and *H. dujardini*.

### Summary:

Biological models are necessary to understand how organisms works, how evolution of living run, to test new treatments or to perform toxicological assessments as well. Cellular culture is one of the methods employed because it is easy to use. However, working on isolated cells doesn't always allow to challenge of the results with more complex conditions as found in full organisms. Biologist needs to develop new biological models for new assessments but the new model choice can be a problem. Murine model, frog, drosophila, yeast, zebrafish,... have each other some benefits and limits. Their choice is directly linked with their use and with the type of research we intend to make.

The aim of our work was to develop biological models to oncopharmacology and aging studies.

The nematode model with *Caenorhabditis elegans* was used in several projects. One study was made on gases. They were tested in terms of toxicity, mutagenicity and cancerogenicity. On the other hand, a new tool was developed for prospective studies on either toxicology or mechanistic with the mitochondrial respiration measure with the Seahorse XF24 Analyzer device.

The second biological model studied is the tardigrade and more exactly *Hypsibius dujardini*. Tardigrades are extremely resistant organisms to harshest conditions. They can resist to desiccation. To gain insights on tardigrade resistance, we have choice to analyze the mitochondrial dynamics in the course of anhydrobiosis exit by using mitochondrial dyes and respiration measurements.

**Key words:** Oncopharmacology, Aging, Resistance, Genetic, *Caenorhabditis elegans*, *Hypsibius dujardini*

### DISCIPLINE

Toxicologie

### INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Equipe F16

Laboratoire de toxicologie du médicament, UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, Université de Montpellier

15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 5