



HAL
open science

Résistance des tardigrades aux stress génotoxiques : Importance de la protection du génome et des systèmes de réparation de l'ADN

Marwan Anoud

► **To cite this version:**

Marwan Anoud. Résistance des tardigrades aux stress génotoxiques : Importance de la protection du génome et des systèmes de réparation de l'ADN. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL013 . tel-04476478

HAL Id: tel-04476478

<https://theses.hal.science/tel-04476478>

Submitted on 25 Feb 2024

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.

Résistance des tardigrades aux stress génotoxiques: Importance de la protection du génome et des systèmes de réparation de l'ADN

*Resistance of tardigrades to genotoxic stress: Importance of genome
protection and DNA repair systems*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582: cancérologie : biologie - médecine-santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Science du cancer
Graduate School : Life Sciences and Health.
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse préparée au sein de l'unité de recherche Structure et Instabilité des Génomes (Université Paris-Saclay), sous la direction de **Carine GIOVANNANGELI**, Directrice de recherche CNRS, la co-direction de **Jean-Paul CONCORDET**, Chargé de recherche INSERM, le co-encadrement de **Anne DE CIAN**, Ingénieure de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 24 février 2023, par

Marwan ANOUD

Composition du Jury

Mireille BETERMIER

Directrice de recherche, Université Paris Saclay Présidente

Karine VAN DONINCK

Professeure, Université libre de Bruxelles Rapporteur & Examinatrice

Eric RÖTTINGER

Directeur de recherche, Université Côte d'Azur Rapporteur & Examineur

Roberto GUIDETTI

Maître de conférence, Université de Modène
et de Reggio d'Émilie Examineur

Titre : Résistance des tardigrades aux stress génotoxiques: Importance de la protection du génome et des systèmes de réparation de l'ADN

Mots clés : Tardigrades, radiotolérance, réparation de l'ADN, transcriptomique, protéomique, Dsup

Résumé : Les tardigrades sont de petits métazoaires aquatiques capables de résister à une grande variété de conditions abiotiques extrêmes ; en particulier, la dessiccation et les rayonnements ionisants qui peuvent induire de nombreux dommages à l'ADN et menacer l'intégrité du génome. Chez le tardigrade *Ramazzottius varieornatus*, une protéine appelée RvDSup (pour *R. varieornatus* DNA Damage Suppressor), semble capable protéger le génome des rayons X. Afin de mieux comprendre leurs mécanismes de résistance aux dommages de l'ADN induits par les rayonnements ionisants, nous avons choisi de nous intéresser à trois espèces de tardigrades : *Hypsibius exemplaris*, dont le génome est séquencé ainsi qu'*Acutuncus antarcticus* et *Paramacrotus fairbanksi*, encore peu étudiés et dont les génomes sont en cours de séquençage. Les cassures simple brin de l'ADN induites par des doses de 100 et 1000 Gy de rayonnements γ ont été analysées chez *H. exemplaris* par migration de l'ADN génomique sur gel d'agarose dénaturant et les cassures double brin par Western blot avec un anticorps spécifique de la forme phosphorylée d'une histone H2AX. Ces analyses ont confirmé que les dommages de l'ADN sont dépendants de la dose administrée et sont majoritairement réparés 72 h après irradiation. Pour identifier les mécanismes impliqués dans la résistance des tardigrades, nous avons mesuré les changements de l'expression des gènes en réponse aux rayonnements γ et à la bléomycine, un antibiotique radiomimétique, par RNA-seq. Ces analyses nous ont permis d'identifier un ensemble de gènes très fortement surexprimés en réponse aux deux traitements et ceci dans les 3 espèces analysées.

Nous avons complété cette analyse du transcriptome par une analyse protéomique chez *H. exemplaris*, ce qui a permis de confirmer qu'un grand nombre de gènes induits au niveau ARNm sont également induits au niveau protéique. Parmi ces gènes, on retrouve de nombreux gènes des voies classiques de la réparation des cassures double brin de l'ADN (NHEJ, HR, MMEJ) mais aussi des gènes de fonctions inconnues qui semblent uniques aux tardigrades. Ces gènes sont des gènes candidats de la résistance aux rayonnements γ des tardigrades dont nous avons choisi d'étudier la fonction. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de gain de fonction par expression hétérologue dans des cellules humaines de la lignée U2OS, qui nous ont permis d'identifier leur localisation subcellulaire et de tester leur capacité à conférer une résistance aux stress génotoxiques en mesurant le nombre de foyers phospho-H2AX induits après traitement à la bléomycine. En particulier, un des gènes testés, qui a été appelé TDR1 (pour Tardigrade DNA damage resistance 1 gene), est capable de diminuer le nombre de foyers phospho-H2AX induits par la bléomycine, et ceci de manière au moins aussi importante que la protéine RvDSup précédemment décrite. De façon remarquable, cette propriété est commune aux 4 orthologues potentiels de TDR1 testés, suggérant que nous avons mis à jour un nouvel acteur important de la résistance des tardigrades aux rayonnements γ . Différentes approches biochimiques et de génomique fonctionnelle, comme l'invalidation des gènes par CRISPR/Cas9, devraient permettre de mieux comprendre leurs mécanismes d'action et confirmer leur activité dans la résistance des tardigrades.

Title : Resistance of tardigrades to genotoxic stress: Importance of genome protection and DNA repair systems

Keywords : Tardigrades, radiotolerance, DNA repair, transcriptomics, proteomics, Dsup

Abstract : Tardigrades are small aquatic metazoans capable of withstanding a wide variety of extreme abiotic conditions; in particular, desiccation and ionizing radiation which can induce extensive DNA damage and threaten genome integrity. In the tardigrade *Ramazzottius varieornatus*, a protein called RvDsup (for *R. varieornatus* DNA Damage Suppressor), is thought to protect the genome from X-rays. In order to better understand the resistance to DNA damage induced by ionizing radiation, we chose to focus on three tardigrade species: *Hypsibius exemplaris*, whose genome has been sequenced, *Acutuncus antarcticus* and *Paramacrobiotus fairbanksi*, which are still little studied and whose genomes are being sequenced. DNA single-strand breaks induced by doses of 100 or 1000 Gy of γ -radiation were analyzed in *H. exemplaris* by migration of genomic DNA on denaturing agarose gel and double-strand breaks by Western blot with an antibody specific for the phosphorylated form of a histone H2AX of *H. exemplaris*. These analyses confirmed that DNA damage is dose dependent and is mostly repaired 72 h after irradiation. To identify mechanisms involved in tardigrade resistance, we measured changes in gene expression in response to γ -radiation and bleomycin, a radiomimetic antibiotic, by RNA-seq. These analyses allowed us to identify a set of genes highly overexpressed in response to both treatments in all 3 species analyzed.

We completed this transcriptome analysis with a proteomic analysis in *H. exemplaris*, which confirmed that a large number of genes induced at the mRNA level are also induced at the protein level. These genes include many genes from the classical DNA double-strand break repair pathways (NHEJ, HR, MMEJ) but also genes of unknown function that appear to be unique to tardigrades. These genes are candidate genes for γ -radiation resistance in tardigrades whose function we chose to study. To this end, we performed gain-of-function experiments by heterologous expression in human U2OS cells, which allowed us to identify their subcellular localization and to test their ability to confer resistance to genotoxic stress by measuring the number of phospho-H2AX foci induced after bleomycin treatment. In particular, one of the genes tested, which was named TDR1 (for Tardigrade DNA damage resistance 1 gene), is able to decrease the number of phospho-H2AX foci induced by bleomycin, and this in a way that is at least as important as the previously described RvDsup protein. Remarkably, this property is common to all 4 potential TDR1 orthologs tested, suggesting that we have uncovered an important new player in tardigrade resistance to γ -radiation. Different biochemical and functional genomics approaches, such as gene invalidation by CRISPR/Cas9, should allow to better understand their mechanisms of action and confirm their role in tardigrade resistance.

À ma maman, pour son amour infini, son soutien et ses encouragements constants jusqu'à l'âge adulte, ainsi que son inestimable contribution à ma formation intellectuelle et à mon développement personnel,

À ma petite rousseur, mon meilleur ami, compagnon de ma vie qui m'a accompagné du brevet des collèges à l'obtention du doctorat et qui m'a comblé de bonheur et apaisé durant toutes ces années,

Remerciements

L'achèvement de ce travail mené sur plusieurs années procure une grande satisfaction. Il est l'occasion de se remémorer les différentes embûches qu'il a fallu surmonter mais surtout les personnes qui m'ont permis d'en arriver là.

Je tiens à remercier chaleureusement les Docteurs Karine Van Doninck et Eric Röttinger d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie le Docteur Roberto Guidetti d'avoir accepté d'être membre du jury, mais aussi d'être notre collaborateur qui nous a permis d'acquérir l'espèce de tardigrade *Acuntucus antarcticus*. Et enfin je remercie la Docteure Mireille Bétermier d'avoir accepté d'être la présidente du jury et membre de mon comité de suivi de thèse. Ses commentaires constructifs et son expertise ont été un soutien inestimable tout au long de ce processus.

Je remercie Jean-Baptiste Boulé et Jean-François Riou, respectivement actuel et ancien directeur de l'unité pour m'avoir donné la chance de travailler dans ce laboratoire. Je les remercie aussi pour leur chaleureux conseils et les chouettes discussions que j'ai pu avoir avec eux.

Je tiens également à remercier vivement mes chers encadrants, les Docteurs Jean-Paul Concordet, Anne De Cian et Carine Giovannangeli pour leur aide, leurs conseils et leur soutien indéfectible tout au long de mon projet de recherche. Sans ces précieux conseils, sans ce soutien moral, sans leur dynamisme, cette thèse n'aurait pas été possible. De sincères remerciements pour votre disponibilité, votre optimisme, votre écoute et votre bienveillance. Vous avez ma profonde gratitude.

Je remercie également les membres de mon équipe passés et présents qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Déjà pour leur bonne humeur constante mais aussi pour leur participation scientifique. Travailler à vos côtés a été intellectuellement très enrichissant. Notamment Alice Brion pour son aide inestimable dans la réalisation des expériences de gain de fonction et d'immunofluorescence, mais aussi Emmanuelle Delagoutte, avec qui ça a toujours été un plaisir d'échanger et de travailler. Il y a bien sûr Quentin Helleu pour le traitement des données transcriptomiques et les échanges très enrichissants et Marie As pour la synthèse de notre protéine candidate. Je remercie Danièle Praseuth et Mathieu Carrara pour leur profonde gentillesse, leur soutien, ainsi que la relecture de mon travail de rédaction. Je n'oublie évidemment pas mes deux bio-informaticiens préférés, Evelyne Duvernois-Berthet et Loïc Ponger pour leur aide dans l'assemblage transcriptomique et l'exploitation du génome, mais aussi leur bonne humeur et leur grande patience face à mes questions de débutant. Merci aux secrétaires du laboratoire Fara, Paule et Charlotte, qui en plus d'être toujours agréables, ont toujours accédé à mes requêtes très rapidement. Un remerciement tout particulier à Anne De Cian, la superwoman du labo qui m'a inspiré et boosté sans relâche pendant toutes ces années.

Merci à l'expertise des membres du CEMIM dont l'inoubliable Professeur Gèze, grand découvreur du Muséum. Mais aussi au grand Cyril, au futur Pr. Fercoq et enfin Renaud Boistel pour leur aide, leur écoute et leur bienveillance.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec qui j'ai passé d'excellents moments. Merci à Alex et Khadij pour leur soutien dans les moments les plus difficiles de cette thèse, pour leurs petites attentions et leurs sourires quotidiens. Merci à Charlotte et Xavier dont la seule présence suffit à me faire rire. Merci pour les sessions calebasse à tue-tête avec le rayon de soleil Coralie Modeste, Valentin Hure et Anna Renoux. Merci aux deux philosophes Jean Châtain et Valentin Rapon pour nos longues discussions pendant lesquelles on a à maintes reprises refait le monde ! Merci à Patrizia Alberti, Carole Saintomé, Laureline Roger pour les conversations toujours passionnantes et leur coup de boost au moral pour tenir durant cette thèse !

Merci à tous les ingénieurs, doctorants et post-doc, ainsi que stagiaires que j'ai rencontré au cours de cette thèse et qui ont partagé des soirées tardives au labo, des soirées jeux, des repas, des barbecues, des galettes, des raclettes, des cleaning day, des soirées dansantes sur les quais de Seine : Virginie Hossard, Bernadette Drayton, Ahmed Kheder, Astrid Lancrey, Loïc Perrouault, Marie Vaisselle, Maxence

Blanchet, Solène Leprince, Noémie Chabot, Mathilde Bertrand, Sarah Kaddah, Etienne Dincuff, Ayman Bin Kamruddin et bien d'autres encore.. !

Merci à mes compagnons de cantine avec qui on a essayé d'épuiser tous les sujets de conversation : Sylvain Geny, Gabriel Leberre, Marie As, Anaïs Goué, Marine Chambeaudie, Çong Çong Li, Gaïa Gentile, Florian Gourmelon, Quentin Helleu, Roberto Alvarez et Yves Janin. Et merci à la queen de la cantine Khadija.

Enfin, je remercie très affectueusement toute ma famille et spécialement mon papa pour son soutien inconditionnel et ses encouragements pendant toutes ses années de thèse. Mais aussi mon petit frère, Yanis, qui m'a changé les idées à de nombreuses reprises grâce à nos longues discussions téléphoniques, ainsi que ma tante Naïma qui m'a été d'une aide inestimable durant cette épreuve.

Je remercie aussi mes précieux amis. Vous m'avez soutenu, fait rire, appris, changé les idées, supporté mes absences pendant toutes ces années de thèse. Du jour où j'ai obtenu ma bourse doctorale jusqu'à la soutenance, vous étiez présents et pour cela je vous en suis infiniment reconnaissant. Marine, Léa M. et W., Claire, Emma, Romain, Perrine, Christelle, Justine, Baptiste, Louise, Jon, Gilou, Félix, Axel et Dany, Nico et Nico, Hugo, Lionel, Julien, Misha, Manon, Alice, Grégoire et Vi, Adrien, Laura Dupuis et Fouzari, les futures Docteurs Gestodt-Kiener et Renaud. J'espère pouvoir encore vivre plein de belles étapes de ma vie avec vous. Une dédicace spéciale au futur Docteur Soren François dont la soutenance doctorale approche et en qui je me reconnaît tant ! Je sais que c'est difficile, mais tout va bien se passer, on croît tous en toi, tu es brillant.

Pour finir, je remercie les tardigrades *Hypsibius exemplaris*, *Acutuncus antarcticus* et *Paramacrobiotus fairbanski* d'avoir joué un rôle central dans cette thèse en « acceptant » d'être irradiés, microinjectés, broyés, lysés, séquencés pour l'amour de la science

Bien sûr cette liste n'est pas exhaustive et je remercie tous ceux qui me connaissent et qui m'ont aidé dans ce projet de près ou de loin...

Merci à toutes et à tous,

TABLE DES MATIERES

Abréviations	15
Introduction	15
Premier chapitre: Etat de l'art	19
I. Présentation générale des tardigrades : un modèle encore peu connu	19
A. Physiologie des tardigrades	19
1. Anatomie des tardigrades	19
a. L'intégument	21
b. Les appendices	22
i. Les pattes	22
ii. Appendices sensoriels	22
c. Cavité corporelle	22
d. Système digestif	23
e. Système musculaire	24
f. Système nerveux	24
2. Cycle de vie et reproduction	25
a. Mode de reproduction	25
b. Cycle de vie	27
B. Distribution géographique des tardigrades	29
1. Tardigrades terrestres et d'eau douce	30
2. Tardigrades marins	31
C. Phylogénie des tardigrades et apparition du phylum tardigrada	32
1. Phylogénie au sein du règne du vivant	32
a. Les tardigrades font partie des ecdysozoaires	32
b. Relations phylogénétiques entre tardigrada et les autres embranchements au sein des ecdysozoaires	32
2. Position des tardigrades au sein des panarthropodes	33
3. Phylogénie au sein de l'embranchement Tardigrada	34
a. Phylogénie des eutardigrades	35
i. Phylogénie des Parachela	36
ii. Phylogénie des Apochela	37
b. Phylogénie des hétérotardigrades	38
4. Paléontologie et datation moléculaire du phylum Tardigrada	38
a. Une possible origine marine	38
b. Adaptation à la vie terrestre	39
II. La tolérance aux conditions extrêmes : le cas particulier de la dessiccation chez les tardigrades	40
	10

A. Adaptation aux conditions extrêmes et cryptobiose	40
a. L'anhydrobiose pour s'adapter à la dessiccation	41
b. Adaptation aux changements environnementaux extrêmes : la cryptobiose	41
c. Mécanismes biologiques de la cryptobiose	42
d. Survie non cryptobiotique chez les tardigrades	45
i. L'enkystement	45
ii. La cyclomorphose	46
iii. Résistance à l'état actif	48
B. Données sur la survie des tardigrades à la dessiccation	49
C. Mécanismes de tolérance à la dessiccation chez les tardigrades	53
1. Voies de signalisation régissant l'anhydrobiose	53
2. Défenses antioxydantes et élimination des radicaux libres	55
a. Voies usuelles de l'élimination des radicaux libres	55
i. Surexpression et expansion des protéines de lutte contre le stress oxydant	55
ii. Une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène?	57
b. Protéines antioxydantes spécifiques aux tardigrades	58
3. Protéines chaperonnes	58
4. Synthèse de bioprotectants et protéines intrinsèquement désordonnées	59
a. Le tréhalose	60
i. Un sucre présent chez de nombreuses espèces résistantes à la dessiccation	60
ii. Mécanismes protecteurs proposés	60
iii. Tous les tardigrades ne font pas usage du tréhalose pour répondre à la dessiccation	61
iv. Chez certains tardigrades, le tréhalose fonctionne de manière synergique avec d'autres protéines protectrices	62
b. Les protéines intrinsèquement désordonnées	63
i. Les protéines LEA ("Late Embryogenesis Abundant")	63
ii. Les protéines désordonnées uniques aux tardigrades : CAHS, SAHS et MAHS	66
III. Les tardigrades : des animaux résistants aux stress génotoxiques	70
A. Données sur la tolérance des tardigrades aux rayonnements ionisants et aux ultraviolets	70
1. Types de stress génotoxiques	71
a. Le stress oxydatif, source majeure de dommages à l'ADN	71
b. Stress génotoxiques liés à la dessiccation	72
c. Rayonnements ionisants	73
d. Rayonnements ultraviolets	74
e. Agents chimiques génotoxiques : la bléomycine	74
2. Survie des tardigrades aux rayonnements ionisants et ultraviolets	75
a. Tolérance aux rayonnements ionisants	75

i. Limites de la comparaison entre les différentes études sur la radiotolérance	75
ii. Description générale de la radiotolérance aux rayonnements ionisants	76
iii. Une radiotolérance à l'état actif plus importante qu'à l'état anhydrobiotique	76
iv. Une radiotolérance plus élevée aux rayonnements à haut TEL ?	77
b. Tolérance aux rayonnements ultraviolets	77
c. Origine de la résistance aux rayonnements ionisants et UV	83
A. Mécanismes mis en jeu pour résister aux stress génotoxiques	84
1. Les dommages à l'ADN et leur réparation	84
a. De nombreux types de dommages à l'ADN et des voies de réparation spécifiques	84
i. Réparation des bases modifiées par Excision de Base (BER)	84
ii. Réparation des mésappariements de bases par la Réparation des Mésappariements (MMR)	85
iii. Réparation des pontages par Excision de Nucléotides (NER)	85
iv. Les cassures double brin sont réparées par différentes voies	85
b. Fonctionnement des principales voies de réparation des cassures double-brin d'ADN	86
i. Détection des CDB	86
ii. Choix de la voie de réparation	87
iii. La voie du c-NHEJ	89
iv. La voie de la recombinaison homologue (HR)	90
v. Les voies Alt-EJ et SSA	91
2. Les systèmes de réparation de l'ADN chez les tardigrades	92
a. p53, le gardien du génome, est présent chez les eutardigrades	93
b. Conservation des gènes du NER et réponses aux UV	94
c. Une expansion des gènes de la voie du BER chez les eutardigrades	94
d. Une voie MMR similaire à celles des autres ecdysozoaires	95
e. La réparation par End Joining est une voie de réparation active chez les eutardigrades	95
f. La recombinaison homologue est présente mais certains acteurs essentiels sont manquants	97
3. Dsup : un acteur de la résistance aux stress génotoxiques	98
a. Une protéine présente chez <i>H. exemplaris</i>	99
b. Un effet protecteur contre les rayonnements ionisants et les radicaux libres in vivo	100
c. Dsup protège de la dégradation de l'ADN par des radicaux libres in vitro	101
d. Domaines fonctionnels de Dsup : interaction avec l'ADN et effet protecteur	102
i. Un domaine de liaison à l'ADN : la région C-Terminale	102
ii. Un motif de liaison aux nucléosomes	103
iii. Des domaines intrinsèquement désordonnés	104
e. Mécanisme protecteur proposé	105
C. Radiotolérances remarquables au sein des eucaryotes	107

1. L'exemple des rotifères bdelloïdes	107
a. Présentation générale des rotifères	108
b. Des animaux tolérants aux stress génotoxiques	108
c. Des mécanismes particuliers de tolérance aux stress génotoxiques	109
i. Reconnaissance d'une grande variété de dommages et "nettoyage" d'extrémités par des protéines acquises par transfert horizontal	109
ii. Des gènes de réparation en copies multiples et sous-fonctionnalisés	110
iii. La conversion génique, un moyen d'échapper à l'accumulation de mutations délétères	111
2. Un insecte résistant à la dessiccation et aux rayonnements ionisants, <i>Polypedilum vanderplanki</i>	112
IV. Problématique et objectifs du travail de thèse	114
Deuxième chapitre: Résultats	116
I. Article: Novel tardigrade unique gene improves resistance to ionizing radiation in human cells	117
II. Résultats complémentaires	118
A. Caractérisation des propriétés de résistance de l'espèce <i>A. antarcticus</i>	118
B. Séquençage de novo, assemblage et annotation du génome d' <i>A. antarcticus</i>	121
C. Un homologue de Dsup chez <i>A. antarcticus</i>	124
1. Identification d'un homologue de Dsup chez <i>A. antarcticus</i>	125
2. HeDsup et AaDsup se localisent dans le noyau en cellules humaines U2OS	125
3. HeDsup et AaDsup diminuent le nombre de foyers γ H2AX en cellules humaines après traitement à la bléomycine	128
4. Caractérisation de l'effet protecteur des mutants de RvDsup en cellules humaines (en cours)	129
III. Matériel et méthode complémentaire: séquençage et assemblage du génome d' <i>Acutuncus antarcticus</i>	131
A. Préparation des échantillons et séquençage du génome d' <i>Acutuncus antarcticus</i>	131
B. Assemblage de novo du génome d' <i>Acutuncus antarcticus</i> et annotation	131
1. Assemblage	131
2. Annotation	132
C. Préparation des banques Omni-C et séquençage Hi-C	133
D. Regroupement en scaffold de l'assemblage avec le protocole HiRise	133
Troisième chapitre: Discussion	134
I. La réponse aux dommages de l'ADN chez les tardigrades	136
A. Impact des rayonnements ionisants sur le génome de <i>H. exemplaris</i> et cinétique de réparation de l'ADN	136
B. Une réponse conservée aux cassures double-brin chez les tardigrades	138
1. Une surexpression massive et conservée des gènes du c-NHEJ	138
2. Une réponse aux CDB conservées pour les acteurs essentiels de la HR et du MMEJ mais pas des gènes de la résection	139
3. Réparation des cassures simple brin chez les tardigrades	142
4. Absence de la protéine ATM: quelles voies de détection des CDB?	142
C. Des gènes uniques aux tardigrades pour pallier aux dommages	144
	13

1. TDR1, un gène présent chez les eutardigrades de l'ordre Parachela	145
2. HeTDR1 se localise dans le noyau des tardigrades et interagit avec l'ADN in vitro	145
3. HeTDR1 diminue le nombre de dommages dans l'ADN après irradiation	146
4. Quel mécanisme pour TDR1?	147
II. Propriété de résistance aux rayonnements ionisants chez <i>A. antarcticus</i>	148
A. <i>Acutuncus antarcticus</i> , un tardigrade très radiotolérant	148
B. Confirmation du rôle protecteur de HeDsup en cellule humaine et de l'orthologue potentiel de Dsup chez <i>A. antarcticus</i> (AaDsup)	149
1. Un nouvel orthologue de Dsup chez <i>A. antarcticus</i> ?	149
2. HeDsup et AaDsup sont nucléaires et confèrent un effet protecteur contre les CDB induites par la bléomycine en cellules humaines	150
C. Assemblage et annotation du génome d' <i>A. antarcticus</i>	150
D. Perspectives à court terme pour caractériser Dsup et exploiter le génome d' <i>A. antarcticus</i>	151
1. Caractérisation supplémentaires des orthologues de Dsup	151
2. Analyse comparative des voies conservées et perdues chez les tardigrades	152
III. Questionnements généraux sur l'adaptation des tardigrades et leur radiotolérance	152
A. Des systèmes de réparation de l'ADN très fidèles?	152
B. Une tolérance supérieure aux rayonnements à haut TEL ?	153
C. Survie à des doses massives de dommages : pertes de voies de réponse aux stress ?	155
Conclusion	157
Bibliographie	158

Abréviations

53BP1 : p53 binding protein 1
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNdb : ADN double brin
ADNsb : ADN simple brin
AlkD : alkylpurine DNA glycosylase
Alt-EJ : Alternative End-joining
AMNP : Anhydrobiosis-related Mn-dependent peroxidase
AMPK : AMP-activated protein kinase
APTX : Aprataxin
ARN : Acide Ribonucléique
ATM : ataxia telangiectasia mutated
BER : Base Excision Repair ou Réparation par excision de bases
BLM : Bloom syndrome protein
BRCA1-2 : breast cancer 1-2
CAHS : Cytoplasmic Abundant Heat Soluble
CDB : Cassure double-brin
CDK : cyclin-dependent kinase
c-NHEJ : Classical Non-Homologous End Joining ou ligation classique des extrémités non-homologues
COI: Cytochrome Oxydase Subunit I
CSB : Cassure simple brin
CtIP : carboxy-terminal binding protein
DNA2 : DNA Replication Helicase/Nuclease 2
DNA-PKcs : DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit
Dsup : Damage Suppressor
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
EtAHS : *Echiniscus Testudo* Abundant Heat Soluble
EXO1 : Exonuclease 1
FEN1 : Flap Structure-Specific Endonuclease 1
Fpg : formamidopyrimidine DNA glycosylase
Gadd45 : Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45
GFP : Green Fluorescent Protein
GST : Glutathion S-transférase
HEK 293-T : human embryonic kidney 293-T
HMGN : High mobility group N
HR : Humidité relative
HR : Homologous recombination ou Recombinaison Homologue
LD50 : Lethal Dose 50 ou Dose létale 50
LEA : Late Embryogenesis Abundant
LIG : Ligase
MAHS : Mitochondrial Abundant Heat Soluble
MLH3 : MutL Homolog 3
MMEJ : Microhomology Mediated End-Joining ou ligation des extrémités par microhomologies
MMR : Mismatch Repair ou Réparation des mésappariements
MRE11 : meiotic recombination 11

mtDNA: ADN mitochondrial
mTOR : mechanistic target of rapamycin
NBS1 : Nijmegen breakage syndrome 1
NER : Nucleotide Excision Repair ou Réparation par excision de nucléotide
PARP 1 – 4 : Poly(ADP-ribose) polymérase 1 – 4
PolQ : Polymérase Q
PP1 : protéine phosphatases sérine/thréonine de type 1
PP2A : protéine phosphatases sérine/thréonine de type 2A
REDD1 : regulated in development and DNA damage responses 1
RH : Homologous recombination ou Recombinaison Homologue
Rif1 : Replication Timing Regulatory Factor 1
RPA : Replication Protein A
SAHS : Secretory Abundant Heat Soluble
Slx : structure-specific endonuclease
SOD : Superoxyde dismutase
SSA : Single-Strand Annealing
STAT5A : Signal Transducer And Activator Of Transcription 5A
TC-NER : Transcription Coupled NER
TEL : Transfert d'Énergie Linéique
TSC1 - 2 : tuberous sclerosis complex 1 – 2
UV : Ultraviolets
UVDE : ultraviolet damage endonuclease
WRN : Werner syndrome RecQ like helicase
XLF : XRCC4-like factor
XPF : Xeroderma pigmentosum de type F
XRCC1 - 5 : X-Ray Repair Cross Complementing 1 - 5

Introduction

La première description anatomique des tardigrades est publiée en 1773 par Johann August Ephraim Goeze peu après l'invention des premiers microscopes. Dès 1774, le chercheur italien Spallanzani, par ailleurs à l'origine de leur nom (qui proviendrait du latin *tardus gradus* « marcheurs lents »), découvre que les tardigrades sont capables d'anhydrobiose, un état de dessiccation extrême réversible, dans lequel l'animal entre dans un état inactif semblable à la mort. Le débat est alors vif dans la communauté scientifique concernant la véracité de cette capacité de résurrection, mais en 1859, Louis Michel François Doyère montre que ces animaux peuvent résister aux hautes températures pendant cet état déshydraté et pourtant « revenir à la vie ». Au début du XIXe siècle, Hermann Baumann conclut que le métabolisme des tardigrades anhydrobiotiques est seulement réduit au minimum, sans toutefois complètement s'arrêter. Avec Rahm, en 1923, et tout au long du XIXème siècle débute une série d'études sur l'influence de facteurs abiotiques tels que le niveau d'oxygène, la pression, la température, les rayonnements UV ou les agents chimiques toxiques, sur la survie des tardigrades anhydrobiotiques qui montrent alors une résilience exceptionnelle à nombre de conditions extrêmes. Keilin définit finalement l'état déshydraté, sous le nom généraliste de cryptobiose (« vie latente ») en 1959.

Avec la découverte de la radioactivité, on commence à soumettre ces animaux aux rayonnements γ ou aux rayons X. Ce sont les tardigrades qui ont montré les plus hauts seuils de tolérance parmi tous les métazoaires avec des LD50_{24h} pouvant aller jusqu'à 5,7Gy (May et al., 1964). Seules des bactéries radiorésistantes comme *Deinococcus radiodurans* ont à ce jour montré des résistances plus élevées aux rayonnements ionisants (Battista, 1997).

Au niveau moléculaire, l'ADN est une cible critique des rayonnements ionisants ou UV qui induisent des cassures simple-brin ou double-brin ou des modifications de bases. Ces animaux possèdent donc des systèmes moléculaires efficaces qui leur permettent de diminuer l'impact des rayonnements sur l'ADN ou des systèmes de réparation qui restaurent l'intégrité du génome.

Une découverte marquante fut faite en 2016 lorsque l'étude de l'espèce *Ramazzottius varieornatus*, a révélé une protéine unique aux tardigrades associée à l'ADN nucléaire qui pourrait avoir une implication dans la résistance des tardigrades aux dommages à l'ADN (Hashimoto et al., 2016b). Les expériences réalisées ont suggéré que cette protéine protège contre les cassures de l'ADN et elle a été nommée DNA damage suppressor ou Dsup.

Cette étude a confirmé, comme dans les travaux sur la dessiccation, que les tardigrades pouvaient posséder des mécanismes de résistance originaux reposant sur l'expression de protéines uniques à ce taxon.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de protection et de réparation de l'ADN qui expliquent l'extraordinaire résistance des tardigrades aux rayonnements ionisants. Pour comprendre comment ils maintiennent l'intégrité de leur génome, une approche intégrée au niveau transcriptomique et protéomique a été menée sur les tardigrades de trois espèces résistantes aux rayonnements ionisants *Hypsibius exemplaris*, *Acutuncus antarcticus* et *Paramacrobiotus fairbanksi*. Ces espèces présentent de nombreux avantages liés à un cycle de vie court, une reproduction parthénogénétique et une facilité d'entretien en laboratoire. Nous avons également caractérisé la radiotolérance du tardigrade *A. antarcticus* et réalisé des études préliminaires sur un orthologue potentiel de Dsup découvert chez cette espèce. Enfin, nous avons réalisé un génome *de novo* annoté de l'espèce *A. antarcticus*.

Ce manuscrit est composé de trois parties, dont la première fait une revue de l'état de l'art sur les tardigrades et leurs tolérances aux conditions extrêmes telles que la dessiccation et les stress génotoxiques. Je conclurai cette première partie en présentant la problématique du sujet de recherche, les objectifs recherchés et la démarche expérimentale adoptée pour y répondre. En deuxième partie, je présente le manuscrit résultant de la majeure partie de ces travaux, ainsi que des résultats non publiés. Enfin, ce travail de thèse se termine par une discussion et une conclusion générale avec les perspectives soulevées par ce travail.

Premier chapitre : Etat de l'art

L'introduction de ce travail se divise en trois grandes parties. Dans la première partie je présenterai le modèle tardigrade. Dans la seconde partie de mon exposé je traiterai de la tolérance des tardigrades à la dessiccation et des mécanismes d'adaptation liés à cette condition extrême. Enfin, dans la dernière partie je me pencherai sur la tolérance des tardigrades aux stress génotoxiques et les mécanismes moléculaires décrits chez ces animaux qui permettent de maintenir l'intégrité de leur génome.

I. Présentation générale des tardigrades : un modèle encore peu connu

Dans un but didactique, j'ai fait le choix de débiter mon introduction en faisant une description générale des tardigrades qui sont des animaux encore peu étudiés. Certains points de description du modèle ne sont pas essentiels à la compréhension du sujet de recherche, mais permettent toutefois de se familiariser avec le modèle.

Ainsi, je commencerai par une description de leur physiologie, de leur milieu de vie ainsi que de leur position dans l'arbre du vivant. Cette partie servira à préciser les caractéristiques et l'emplacement des espèces étudiées durant ma thèse.

A. Physiologie des tardigrades

1. Anatomie des tardigrades

Les tardigrades sont de petits animaux dont la taille est comprise entre 100 et 1200 μm . C'est un taxon très diversifié et les études phylogénétiques basées sur les données

morphologiques et moléculaires indiquent l'existence de 2 classes au sein du phylum Tardigrada : les groupes Eutardigrada et Heterotardigrada.

Les eutardigrades (classe Eutardigrada) décrits sont le plus souvent semi-terrestres et sont capables de tolérer à la fois les milieux aquatiques et terrestres. D'autres espèces de cette classe sont plus spécialisées et ne se trouvent que dans les milieux aquatiques, très majoritairement d'eau douce. Elles ont une morphologie relativement uniforme.

Les hétérotardigrades (classe Heterotardigrada), majoritairement marins ou intertidaux présentent quant à eux une bien plus forte variété de morphologies.

Dans cette partie je présenterai la morphologie et l'anatomie fonctionnelle des tardigrades. Ce faisant, je citerai les différences spécifiques entre les deux classes.

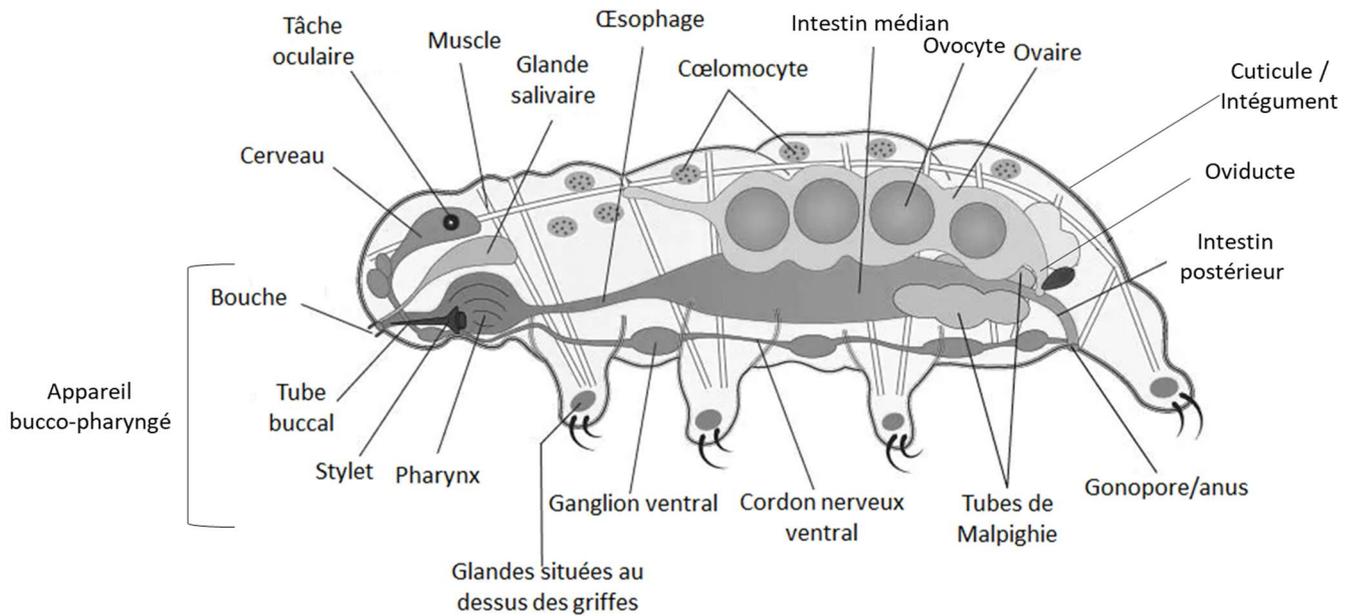


Figure 1 : Anatomie interne d'un tardigrade en vue latérale. (Image modifiée issue de Rachael, 2021).

a. L'intégument

Le corps des tardigrades est enveloppé d'une cuticule multicouche acellulaire d'épaisseur variable composée de chitine et d'un épiderme monocouche sous-jacent sécrétant la cuticule (Greven and Greven, 1987; Møbjerg et al., 2018). Ces couches forment ce qu'on appelle l'intégument du tardigrade. La cuticule est assez résistante pour résister aux pressions mécaniques et à l'abrasion superficielle mais est aussi assez flexible et permet la locomotion et la ponte durant la reproduction (Czernekova and Vinopal, 2021).

L'intégument prend des couleurs variables, présentant différents degrés de transparence allant du blanc au brun qui provient de certaines cellules ou de leur contenu stomachal. La couleur provient de pigments dont l'origine est vraisemblablement alimentaire, comme les carotènes retrouvés dans l'intégument ou la cavité corporelle de certaines espèces. Par ailleurs, les tardigrades semi-terrestres présentent une coloration plus prononcée qui pourrait leur servir à se protéger contre les rayons ultraviolets ou contre le stress oxydant (Bonifacio et al., 2012). Les tardigrades semi-terrestres réduisent de manière significative le volume de leur cavité corporelle et ce en quelques minutes seulement par déshydratation quasi-complète en réponse à la dessiccation du milieu et ceci suggère que leur intégument peut être hautement perméable (Crowe, 1972; Halberg et al., 2013a).

Comme les membres du super-embranchement des ecdysozoaires, les tardigrades passent par des processus de mues pendant lesquels ils remplacent leur cuticule. Pendant ce processus la totalité de l'intégument et les parties sclérifiées de l'appareil bucco-pharyngé et du rectum ainsi que les stylets buccaux qui permettent de percer les aliments sont remplacés (Guidetti et al., 2012).

Les eutardigrades décrits possèdent une cuticule simple, avec des variations d'épaisseur en fonction de l'espèce, leur donnant un aspect lisse à l'exception de certaines espèces comme le genre *Calohypsibius* (Gąsiorek et al., 2019) qui présente des épines cuticulaires. Les hétérotardigrades possèdent des formes de cuticules beaucoup plus variables, avec un

ensemble d'organes sensoriels qui ornent la cuticule et qui peuvent prendre la forme d'ailes (ou alae), de piliers ou d'épines (Møbjerg et al., 2018)

b. Les appendices

i. Les pattes

Les tardigrades possèdent 4 paires de pattes sans articulation. Les 3 premières paires de pattes sont localisées de manière ventrolatérale et sont utilisées pour la locomotion de l'animal, tandis que la 4^{ème} paire, dirigée côté postérieur, leur permet de s'agripper aux substrats sur lesquels ils évoluent. Certains tardigrades marins de la classe des hétérotardigrade possèdent des pattes télescopiques rétractables (Møbjerg et al., 2018).

ii. Appendices sensoriels

Chez les eutardigrades, on trouve parfois des cellules sensorielles très réduites situées au niveau céphalique qui pourraient faire office de récepteurs sensoriels (Walz, 1978), mais leurs fonctions sont encore mal connues. Les hétérotardigrades, en revanche, se caractérisent par la présence d'un éventail d'appendices sensoriels céphaliques appelés cirre et clavae qui sont des structures complexes pouvant avoir des fonctions mécanoréceptrices ou chémoréceptrices (Møbjerg et al., 2018).

c. Cavité corporelle

Les organes internes des tardigrades baignent dans un fluide au sein de leur cavité corporelle. Ils ne possèdent pas de système respiratoire ou circulatoire, ainsi l'eau, les gaz, les nutriments et les électrolytes circulent via ce fluide par diffusion et par transport membranaire actif au travers de certains épithéliums (Halberg and Møbjerg, 2012). Il a été montré chez de nombreux tardigrades qu'ils pouvaient osmoréguler efficacement en faisant entrer constamment de l'eau dans la cavité et en éliminant l'eau en excès, vraisemblablement via l'épithélium digestif de l'intestin moyen (Halberg et al., 2013b, 2009). Dans leur cavité

corporelle baignent des coelomocytes (ou cellules de stockage) qui font probablement office de réserves énergétiques en accumulant polysaccharides et lipides (Hyra et al., 2016). Elles pourraient également avoir un rôle défensif en phagocytant les bactéries (Møbjerg et al., 2018).

d. Système digestif

De manière générale, les tardigrades peuvent se nourrir de bactéries, de plantes, de champignons ou de très petits animaux comme les nématodes ou les rotifères (Bryndová et al., 2020). Bien que les données sur le régime alimentaire restent peu nombreuses, il semble que beaucoup d'espèces sont préférentiellement herbivores ou carnivores. Concernant les trois espèces étudiées au cours de ma thèse, deux d'entre elles, *H. exemplaris* et *A. antarcticus*, se nourrissent et peuvent se développer en mangeant des microalgues vertes comme *Chlorella vulgaris*. Il a été documenté que *H. exemplaris* peut également se nourrir d'autres types de microalgues vertes comme *Chlorococcum sp.*, de certaines cyanobactéries, de champignons comme *Saccharomyces cerevisiae*. La troisième espèce étudiée, *P. fairbanksi*, est cultivée en présence de *Chlorella vulgaris* et de rotifères, dont les adultes se nourrissent, mais il a été décrit que ce tardigrade pouvait se nourrir également de cyanobactéries de type *Nostoc sp.*, de *S. cerevisiae* ou de petits métazoaires comme des nématodes, des rotifères ou même d'autres tardigrades (Bryndová et al., 2020).

Au niveau anatomique, le système digestif des tardigrades se compose d'un appareil buccal comprenant une bouche contenant de nombreux récepteurs sensoriels et d'un stylet qui leur permet de percer la nourriture (**Figure 1**). Ils possèdent également un œsophage suivi d'un intestin médian qui est vraisemblablement le lieu d'absorption des nutriments et d'échange d'eau et de solutés avec la cavité corporelle. Les eutardigrades possèdent des tubes de Malpighi reliés au carrefour de l'intestin médian et postérieur. On pense que ces tubes, en raison de leur position, sont impliqués dans la production de l'urine, mais également dans l'osmorégulation (Halberg et al., 2009). Ces tubes se déversent dans l'intestin postérieur, au même titre que le contenu de l'intestin médian et des gamètes venant du système reproductif. L'intestin postérieur donne sur un cloaque où passent à la fois le bol stomacal

et les gamètes. Chez les hétérotardigrades, les tubes de Malpighi sont absents et leurs anus et gonopores sont séparés (Møbjerg et al., 2018).

e. Système musculaire

Le système musculaire des tardigrades peut se diviser en deux types de muscles, les muscles somatiques et les muscles viscéraux.

Les muscles somatiques sont composés de fibres musculaires indépendantes. Ils traversent la cavité corporelle de l'animal en étant attachés à la cuticule via des cellules épithéliales qui servent de points d'attache présents sur toutes les parties de l'intégument, de la tête aux pattes. Ces muscles permettent la locomotion, le mouvement et la flexibilité des tardigrades. Ils sont également à l'origine de la réorganisation structurale du corps durant la cryptobiose, qui voit réduire la taille de l'animal après excrétion de l'eau contenue dans l'organisme.

Les muscles viscéraux sont associés aux organes internes, en les suspendant : intestins, tubes de Malpighi, gonades ainsi que les tubes et conduits qui relient ces organes. Ils permettent également la fermeture du cloaque chez les eutardigrades ou du gonopore chez les hétérotardigrades. La musculature bucco-pharyngée impliquée dans la nutrition de l'animal est aussi composée de muscles viscéraux (Møbjerg et al., 2018). Enfin, ils sont également impliqués dans le phénomène de contraction du corps en réponse à la dessiccation chez certains tardigrades (qui par exemple réduit la taille de l'eutardigrade *Richtersius coronifer* de 87%). Ils permettent la réorganisation des organes internes à l'entrée et à la sortie de la forme inactive en dessiccation (Halberg et al., 2013a).

f. Système nerveux

Le système nerveux baigne dans la cavité corporelle, simplement entouré d'une membrane. Ainsi l'hypothèse a été faite qu'en plus de jouer son rôle dans le transfert de signaux électrochimiques aux organes et aux muscles, il aurait aussi un rôle endocrine de relargage d'hormones directement dans la cavité corporelle pour contrôler certaines fonctions comme

la reproduction (Schulze and Persson, 2015). Il contient le tiers de cellules de l'organisme chez l'hétérotardigrade *Haplobiotius crispae* (Møbjerg et al., 2011).

Au niveau du cerveau, le système nerveux est bilatéral, symétrique et composé de 3 paires de lobes cérébraux qui sont traversés par le tube buccal et les stylets. Des tâches oculaires photoréceptrices connectées au 1^{er} lobe cérébral sont situées sur la tête de nombreux eutardigrades et hétérotardigrades de la famille des Echiniscoidea.

Au niveau du corps, le système nerveux comporte des ganglions et cordons nerveux qui s'étendent jusqu'à la région postérieure de l'organisme et sont reliés aux lobes cérébraux au niveau antérieur. Il comporte en particulier un ganglion ventral par paire de pattes (Persson et al., 2014, 2012).

2. Cycle de vie et reproduction

a. Mode de reproduction

Les tardigrades sont des animaux ovipares qui peuvent se reproduire par reproduction sexuée ou asexuée. Le mode de reproduction dépend de l'habitat, des conditions environnementales et de l'espèce (Bertolani, 2001). La parthénogenèse est le seul mode de reproduction asexué qui a été observé chez les tardigrades. La reproduction sexuée peut être gonochorique ou hermaphrodite (Altiero et al. 2018).

La parthénogenèse est donc très répandue parmi les tardigrades et a été uniquement retrouvés parmi les eutardigrades et les hétérotardigrades de l'ordre Echiniscoidea, tandis que chez les hétérotardigrades marins (arthrotardigrades) n'a été observée que de la reproduction sexuée. Elle peut être obligatoire ou facultative. La parthénogenèse facultative permet à des espèces se reproduisant par reproduction sexuée, d'alterner par une reproduction parthénogénétique sous certaines conditions (Jeziarska et al., 2021).

La parthénogenèse chez les tardigrades peut être automictique (avec une phase de méiose pour rétablir la diploïdie) ou apomictique (absence de méiose, seulement des mitoses) très généralement thélytoque, c'est-à-dire qu'elle ne donne naissance qu'à des femelles. Toutefois, dans certains cas décrits comme thélytoques des mâles ont été retrouvés, suggérant que les mécanismes de reproduction des tardigrades restent encore très méconnus (**Figure 2**).

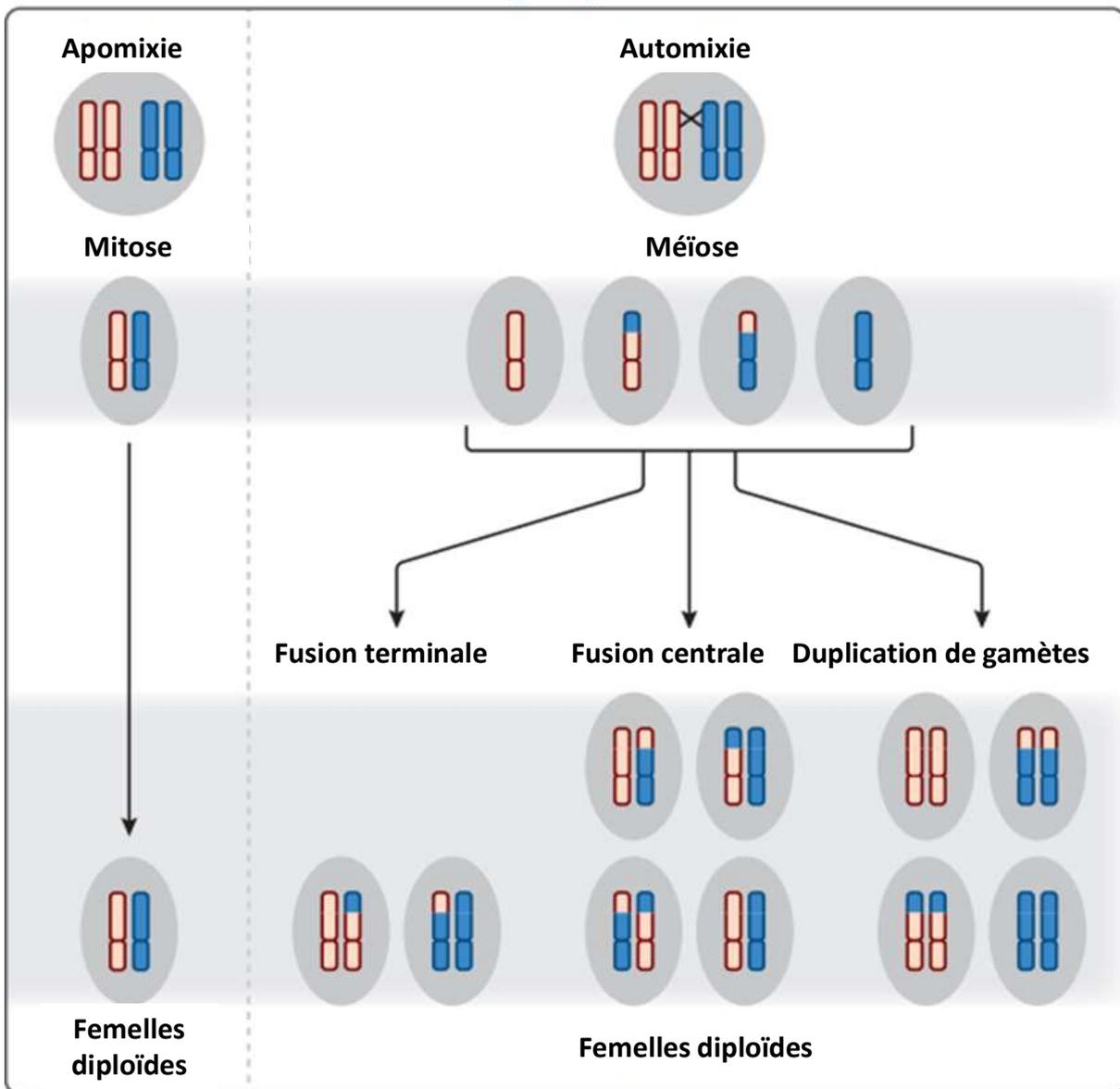


Figure 2 : Schéma du mode de reproduction de parthénogenèse thélytoque chez les tardigrades. Pour la parthénogenèse automictique est représenté le cas d'une recombinaison par crossing-over pour représenter l'impact sur le niveau d'hétérozygotie (Traduit de Rabeling and Kronauer, 2013).

Chez les tardigrades, la parthénogenèse apomictique est souvent associée à une triploïdie ou plus rarement à une tétraploïdie (Rebecchi et al. 2003b)

Chez *H. exemplaris*, espèce diploïde ($2n=10$ chromosomes), la parthénogenèse a été décrite comme automictique thélytoque, avec une endomitose après la méiose 1 et l'absence de méiose 2 (Ammermann, 1967). C'est toutefois la seule étude qui a été faite sur cette espèce et davantage d'études de son mode de reproduction sont nécessaires pour confirmer ceci avec certitude.

A. antarcticus ($2n=12$ chromosomes) (Altiero et al. 2015) a été décrit comme réalisant une parthénogenèse automictique thélytoque, toutefois elle n'a pas été décrite en détail. Enfin aucune description du mode exact de reproduction parthénogénétique de *P. fairbanksi* n'existe, mais Guidetti et al. 2019 suggèrent que cette espèce est triploïde ($n=17-18$) et réalise une parthénogenèse apomictique thélytoque.

b. Cycle de vie

Le cycle de reproduction d'un Eutardigrade parthénogénétique se compose des étapes suivantes : développement embryonnaire, éclosion, croissance du juvénile par mues successives, atteinte de la maturité sexuelle, production d'œufs, ponte et mue (**Figure 2**). La maturité sexuelle est généralement acquise à la deuxième ou troisième mue, plus rarement à la première (Ramazzotti and Maucci, 1983; Altiero et al., 2018). La production d'œufs a lieu pendant tout l'âge adulte des tardigrades et dépend grandement des conditions de culture (température, disponibilité en oxygène et en nourriture). A partir d'études en laboratoire, en conditions contrôlées, on peut obtenir les caractéristiques biologiques des espèces cultivées en laboratoire. Des variations du cycle de vie peuvent être observées au sein d'une même population comme montré dans le **tableau 1** pour *P. fairbanksi*.

Les tardigrades limniques et terrestres produisent soit des œufs lisses dans leur mue cuticulaire ou exuvia (*H. exemplaris*), soit des œufs très ornementés, produits sans mue (*A. antarcticus*, *P. fairbanksi*).

Espèce	Mode de reproduction	Durée de vie (jours)	Durée de vie max. (jours)	Age à l'oviposition (jours)	Nombre d'ovipositions par animal	Taux d'éclosion	Nombre max. d'œufs par ponte (fertilité)	Reference
<i>Hypsibius exemplaris</i>	Parthénogenèse	61.9 ± 9.9	75	8.0 ± 3.1	10.5 ± 2.2	90-100 %	8	Vasanthan et Stone, 2020
<i>Acutuncus antarcticus</i>	Parthénogenèse	69.2 ± 36.4	162	9.3 ± 1.1	7.5	97.6 %	10	Tsujimoto et al. 2015
<i>Paramacrobotus fairbanksi</i> ^{1*}	Parthénogenèse	194.9 ± 164.4	518	76.9 ± 16.4	16	83-95.8%	11.0 ± 7.1	Altiero et al. 2006, 2010
<i>Paramacrobotus fairbanksi</i> ^{2*}	Parthénogenèse	137.3 ± 136.4	457	70.7 ± 19.4	15	51-87%	8.0 ± 6.2	Altiero et al. 2006, 2010

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques des espèces étudiées dans ce travail de recherche.

* 2 clones ont été testés dans les études de Altiero et al. 2006, 2010 : ¹Clone nommé CDMr01 ; ²Clone nommé CDMr02. Cette espèce avait été initialement identifiée comme étant *Paramacrobotus richtersi* par (Altiero et al., 2006) mais a été ré-identifiée comme étant *Paramacrobotus fairbanksi* par (Guidetti et al., 2019).

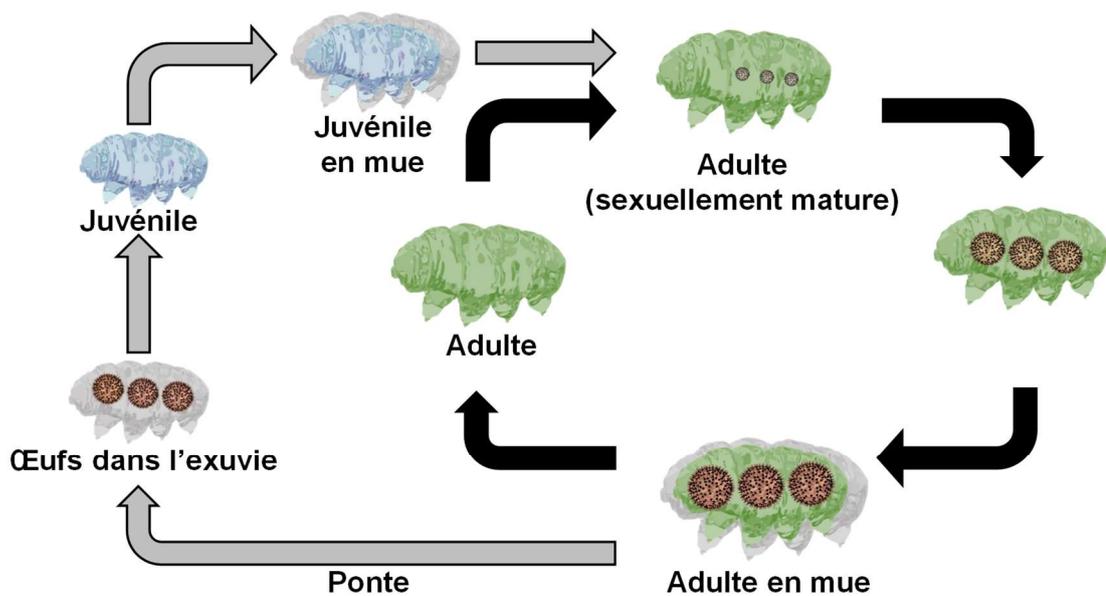


Figure 3 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle de vie d'un eutardigrade. Lors de la ponte, les œufs peuvent être pondus dans l'exuvie ou libres en fonction de l'espèce. Dans le cas de *H. exemplaris* qui pond dans l'exuvie. (Inspiré de Altiero et al., 2018).

B. Distribution géographique des tardigrades

Parmi les tardigrades, ce sont les espèces terrestres et intertidales qui montrent des capacités de survie aux changements extrêmes des conditions de leur milieu. Toutefois les tardigrades ne sont pas à proprement parler des extrémophiles mais plutôt des organismes extrêmotolérants qui peuvent survivre aux conditions extrêmes, préférant néanmoins les milieux plus cléments. Grâce à des adaptations spécifiques, comme la cryptobiose, certaines espèces de tardigrades arrêtent leur métabolisme, ce qui leur permet de persister dans des habitats dépourvus d'eau et peu propices à la vie. Ainsi, il semble important de comprendre la biogéographie des tardigrades pour comprendre dans quelles conditions leurs capacités de résistance ont été acquises.

Les tardigrades sont présents de manière ubiquitaire sur tous les biomes de la planète. En effet, ils pourraient être déplacés sur de courtes distances grâce aux vents ou aux courants marins. Il a également été démontré que certaines espèces étaient transportées sur des distances intercontinentales en étant fixées sur des oiseaux migrateurs (Mogle et al., 2018). La conséquence de cette dispersion est qu'ils sont souvent décrits comme des animaux cosmopolites (Degma et al. 2023). Pourtant, la majorité des espèces étudiées sont restreintes à des zones géographiques bien délimitées. Néanmoins plusieurs espèces sont retrouvés sur plusieurs régions biogéographiques, voire dans toutes les régions terrestres étudiées comme *Paramacrobotus fairbanksi* ou *Milnesium inceptum* (anciennement appelé *Milnesium tardigradum*) (Pilato and Binda, 2001; Nelson, 2002; Kaczmarek et al. 2010).

1. Tardigrades terrestres et d'eau douce

En 2019, 80% des espèces de tardigrades décrites sont semi-terrestres (Degma et al., 2019). De nombreuses espèces vivent sur des substrats à humectation périodique, notamment par la pluie, mais qui peuvent parfois se dessécher complètement (Vicente and Bertolani, 2013). La variété de substrats sur lesquels ils vivent comprend les mousses et les lichens, eux-mêmes fixés sur des roches, sédiments, troncs d'arbres, bois morts ou même sur des constructions humaines comme les murs, haies ou toits. On retrouve également des tardigrades dans l'humus des forêts, quel que soit le type de forêt. Les tardigrades semi-terrestres sont aussi retrouvés dans des piscines naturelles temporaires comme des flaques ou les mares. Ces habitats sont libres de prédateurs et riches en nutriments, en faisant des niches de choix (Nelson et al., 2018). De manière plus globale, on retrouve des tardigrades terrestres dans les déserts, les plaines, les forêts, la toundra, les sommets montagneux et les pôles Arctique et Antarctique (Nelson et al., 2018).

Les 3 espèces étudiées pendant mes recherches sont semi-terrestres et sont retrouvées à la fois dans les environnements terrestres comme les mousses ou aquatiques comme les flaques temporaires, les étangs ou les lacs (GAšiorek et al., 2018; Kaczmarek et al., 2020; Tsujimoto et al., 2014). Tandis que *H. exemplaris* et *P. fairbanksi* sont des espèces cosmopolites, *A. acutuncus* est retrouvé dans les régions polaires comme l'Antarctique, une

région extrême et variable en termes de températures, disponibilité en eau et changements météorologiques (Tsujimoto et al. 2015; Peck et al. 2006).

2. Tardigrades marins

Au niveau marin, ils sont retrouvés dans tous les océans et mers, aussi bien dans les zones intertidales que subtidales. La majorité des espèces marines décrites sont néanmoins intertidales et vivent dans les zones sableuses ou bien à la surface de différents substrats ou sur d'autres organismes (Nelson et al., 2018). Cette sur-représentation des espèces intertidales est probablement due à la plus grande facilité de récolte des échantillons.

Ils sont par ailleurs considérés comme des membres importants des méiofaunes benthiques et épiphytiques dans les milieux aquatiques (Nelson et al., 2015). Certaines espèces peuvent se déplacer passivement grâce aux courants au-dessus des substrats présents dans les fonds (Kristensen and Renaud-Mornant, 1983).

D'autres espèces sont retrouvées dans les régions abyssales comme *Genus coronactus* vivant jusqu'à 5730m de profondeur (Júnior et al., 2020). Le tardigrade *Moebjergarctus manganis* est par exemple adapté de manière spécifique à un seul micro-habitat, en vivant sur les nodules de manganèse à des profondeurs situées entre 4140-4170m (Bussau, 1992). Aucune étude physiologique n'a encore été réalisée sur ces tardigrades, mais il est probable que dans un habitat si spécialisé subissant une forte pression, dépourvu de lumière et d'oxygène et dont les concentrations de certains métaux lourds sont très élevés, cette espèce ait développé des stratégies de protection contre les conditions hostiles et des stratégies de production énergétique à partir des substrats environnants à l'instar des autres espèces vivant dans ces écosystèmes (Ponnudurai et al., 2017).

C. Phylogénie des tardigrades et apparition du phylum tardigrada

La phylogénie du phylum tardigrada n'est pas complètement élucidée et est alimentée par l'acquisition croissante de données moléculaires et morphologiques. Afin de mieux comprendre chez quelles espèces et à quel moment les adaptations conférant une résistance aux stress extrêmes sont apparus, il est pertinent d'avoir une compréhension globale de la phylogénie des tardigrades.

Je décrirai dans cette partie comment le phylum tardigrada se positionne au sein du règne animal, puis la classification à l'intérieur du phylum, en me concentrant davantage sur les eutardigrades dont nos modèles d'étude font partie.

1. Phylogénie au sein du règne du vivant

a. Les tardigrades font partie des ecdysozoaires

Selon les données morphologiques et moléculaires, les tardigrades sont classés dans le super-embranchement des ecdysozoaires (Edgecombe, 2010; Telford et al., 2008a). Il s'agit d'un des deux clades de protostomiens (l'autre étant les lophotrocozoaires). Dans ce clade, tous les animaux se développent par une ou plusieurs mues de leur cuticule. Ce processus de mue s'appelle l'ecdysis, d'où ce clade tire son nom (Aguinaldo et al., 1997). La position des tardigrades au sein des ecdysozoaires a longtemps été controversée mais les avancées récentes en phylogénie moléculaire ont permis de confirmer cette position.

b. Relations phylogénétiques entre tardigrada et les autres embranchements au sein des ecdysozoaires

Initialement, les tardigrades étaient classés avec les nématodes dans le groupe polyphylétique, maintenant obsolète, des aschelminthes en raison de critères

morphologiques communs. Ces critères comptaient la présence d'un pharynx triradié, de stylets buccaux et la capacité à entrer en cryptobiose. En ajoutant à l'analyse morphologique, l'analyse de données moléculaires obtenues par la comparaison de séquences protéiques et géniques, les analyses phylogénétiques ont gagné en précision (Kinchin, 1994). En utilisant des séquences de micro-ARNs et les gènes ribosomiaux 18s et 28s, pour reconstruire la phylogénie des ecdysozoaires, il a été conclu que les tardigrades étaient des panarthropodes au même titre que les arthropodes et les onychophores (Campbell et al., 2011; Rota-Stabelli et al., 2013).

2. Position des tardigrades au sein des panarthropodes

En considérant que les tardigrades font partie des panarthropodes, plusieurs hypothèses se présentent quant à leurs relations phylogénétiques au sein de ce clade et il ne semble pas vraiment encore y avoir de consensus quant à ces hypothèses (Smith and Goldstein, 2017; Jørgensen et al., 2018). Soit le taxon Tardigrade est à la fois le groupe frère des arthropodes et des onychophores (hypothèse des lobopodes), soit il est le groupe frère des arthropodes (hypothèse des tactopodes), soit il est le groupe frère des onychophores (Budd, 2001).

L'hypothèse des lobopodes qui infère la position des tardigrades comme groupe frère à la fois des arthropodes et des onychophores est appuyée par plusieurs analyses moléculaires (Campbell et al., 2011; Hejnol et al., 2009; Rota-Stabelli et al., 2013).

L'hypothèse des tactopodes place les tardigrades en tant que groupe frère des arthropodes en raison de la présence d'une cuticule semblable, d'un cerveau en 3 parties et d'un système nerveux constitué d'une série de ganglions, reliés par un cordon nerveux ventral comme chez les arthropodes (Persson et al., 2014, 2012; Telford et al., 2008b).

Enfin, l'hypothèse statuant de la proche parenté entre tardigrades et onychophores était la moins vraisemblable car peu d'analyses moléculaires appuyaient cette hypothèse (Campbell et al., 2011, sec. Supplementary material; Rota-Stabelli et al., 2010) mais des travaux récents appuient désormais cette hypothèse (Marlétaz et al., 2019).

3. Phylogénie au sein de l'embranchement Tardigrada

La phylogénie au sein de l'embranchement tardigrada a beaucoup évolué. Initialement, leur phylogénie était seulement inférée en utilisant certaines caractéristiques morphologiques de manière non-exhaustive, ce qui pouvait biaiser la classification phylogénétique (Kristensen and Higgins, 1984; Pollock, 1995). Ainsi l'ajout de la phylogénie moléculaire aux données morphologiques a permis d'inférer la phylogénie au sein de l'embranchement Tardigrada plus précisément. Des approches de phylogénie multigéniques ou transcriptomiques ont été réalisées. Les gènes les plus utilisés pour inférer la phylogénie des tardigrades sont les gènes ribosomiaux 18s et 28s, les gènes mitochondriaux (Sous-unité I de la Cytochrome Oxydase, COI mtDNA) ainsi que les protéines nucléaires EF1a, EF2 et la grande sous-unité de l'ARN polymérase II car ils évoluent très lentement en raison de la pression de sélection qu'ils subissent (Regier et al., 2004; Guidetti et al. 2009).

De nombreuses données moléculaires confirment la monophylie des classes hétérotardigrades et eutardigrades (Jørgensen et al., 2010; Jørgensen and Kristensen, 2004; Nichols et al., 2006). Ainsi, l'embranchement Tardigrada est composé de 2 classes que sont les eutardigrades et les hétérotardigrades (**Figure 4**). Une troisième classe appelée mésotardigrades a été proposée, mais elle ne contient qu'une seule espèce appelée *Thermozodium esakii* (Grothman et al., 2017), originaire d'une source chaude au Japon. Cette espèce n'a jamais été retrouvée depuis la description faite par Rahm en 1939, rendant son existence douteuse.

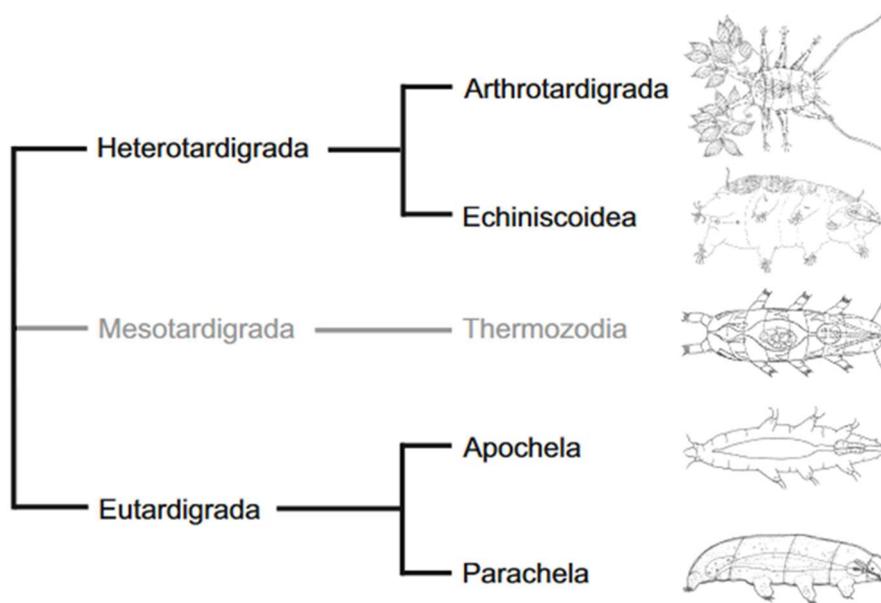


Figure 4 : Relations phylogénétiques entre les différentes classes et ordres de tardigrades. En raison de l'absence de matériel biologique disponible et la disparition du lieu de leur découverte, la classe Mesotardigrada est considérée hypothétique jusqu'à l'apport de nouvelles preuves (partie grisée) (Jørgensen et al., 2018).

a. Phylogénie des eutardigrades

La classe Eutardigrada, majoritairement semi-terrestre et d'eau douce contient la majorité des espèces de tardigrades décrites. Cette classe est composée de deux ordres appelés Apochela et Parachela (Jørgensen et al., 2018). Morphologiquement, ils possèdent un cloaque, un intestin moyen droit, des tubes de Malpighi, deux doubles griffes sur chaque patte et l'absence de nombreux organes sensoriels sur la tête, le corps et les appendices, au contraire des Heterotardigrada (**Figure 1**). De nombreuses données moléculaires appuient la monophylie de la classe Eutardigrada. Les relations phylogénétiques au sein de la classe ne sont pas clairement établies et je les présente en **figure 5**.

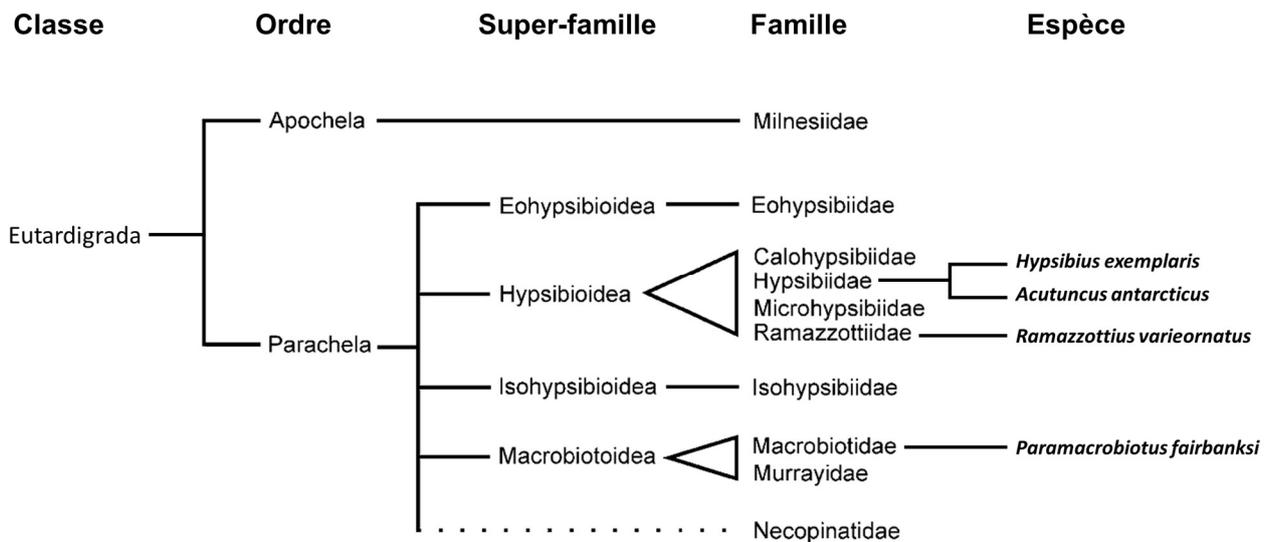


Figure 5 : Relations phylogénétiques entre les eutardigrades. Les relations entre les clades au sein des Hypsibioidea et Macrobioidea sont pour le moment inconnues. Sont placées au bout de l'arbre, les espèces étudiées durant mon travail de recherche, ainsi que *R. varieornatus* (Figure modifiée issue de Bertolani et al. 2014 et Jørgensen et al. 2018).

i. Phylogénie des Parachela

Morphologiquement, les Parachela se caractérisent par l'absence d'appendices sensoriels céphaliques externes, sauf au niveau de la région péribuccale, la présence de griffes primaires et secondaires fusionnées et des placoïdes pharyngés cuticulaires (Jørgensen et al., 2018).

Les études les plus récentes infèrent grâce aux gènes ribosomiaux 18S et 28S, la présence d'au moins 4 super-familles au sein des Parachela : Eohypsibioidea, Hypsibioidea, Isohypsibioidea, Macrobioidea. Une famille appelée Necopinatidae a été inférée au groupe Parachela sur la base de données morphologiques, mais ils n'ont pas été inclus, pour le moment, dans les analyses moléculaires (Bertolani et al., 2014; Guil and Giribet, 2012).

Malgré ces avancées, il n'y a pas pour le moment de consensus clair quant à la définition des clades majeurs des Parachela, et la phylogénie présente toujours des incongruences entre les différentes méthodes. L'accès à un nombre croissant de données génomiques et

transcriptomiques permettront probablement dans un futur proche de préciser ce clade. Les espèces étudiées durant ce travail de thèse font toutes partie de l'ordre Parachela. *H. exemplaris* et *A. antarcticus* appartiennent à la famille des Hypsibiidae, elle-même incluse dans la super-famille des Hypsibioidea dont *R. varieornatus* fait partie (Ramazottiidae). Enfin la troisième espèce étudiée *P. fairbanksi* fait partie de la famille des Macrobiotidae, elle-même incluse dans la super-famille des Macrobiotioidea. Une inférence phylogénétique basée sur les facteurs d'élongation EF1a, EF2 et la grosse sous-unité de la Polymérase II puis une estimation des temps de divergences suggère une séparation entre les clades des Macrobiotidae et des Hypsibiidae il y a plus de 200 millions d'années (Regier et al. 2004). Selon cette même étude, les Parachela auraient divergé des Apochela entre 433 et 474 millions d'années (Regier et al. 2004), mais la méthode de datation moléculaire utilisée reste sujette à controverse et ces données ne doivent être prises qu'à titre indicatif.

ii. Phylogénie des Apochela

Les Apochela ne contiennent qu'une seule famille de tardigrades appelée Milnesiidae composée de 4 genres. Aucune donnée moléculaire n'est disponible pour 3 de ces genres, sauf le genre *Milnesium*. Ainsi, aucune relation phylogénétique supplémentaire n'a pu être établie. Morphologiquement, les Apochela possèdent des papilles latérales au niveau de la tête ainsi que des griffes primaires et secondaires séparées et émanant directement de la patte au lieu d'être fusionnées.

Guil et Giribet, 2012 suggèrent que la classe Heterotardigrada est en fait un groupe frère de l'ordre Apochela pourtant classifié au sein des eutardigrades. Cette possibilité pourrait signifier que l'ordre Apochela est en réalité une classe de transition et qu'ils sont les « vrais » mésotardigrades qui séparent les hétérotardigrades des eutardigrades. Plus récemment, Guil et al. 2019, en regard de données morphologiques et moléculaires, ont proposé d'élever l'ordre Apochela au rang de classe et de les appeler Apotardigrada. Ainsi les Parachela deviendraient les nouveaux Eutardigrada. Toutefois, Morek et Michalczyk, 2020 ainsi que Fleming et Arakawa, 2021 doutent de cette nouvelle classification, ce qui montre que le débat dans ce domaine reste controversé et sujet à modifications.

b. Phylogénie des hétérotardigrades

Les hétérotardigrades sont une classe très diversifiée, divisée en 2 groupes, les arthrotardigrades (ou Arthrotardigrada), exclusivement marins et les Echiniscoidea qui peuvent être tidaux, semi-terrestres ou limniques (Guil and Giribet, 2012).

Ils ont une morphologie qui se caractérise par la présence d'un diverticule latéral au niveau de l'intestin moyen, la présence d'un gonopore et d'un anus distinct et de nombreux organes sensoriels céphaliques.

L'analyse des gènes ribosomiaux 28S a permis de tester la monophylie des Echiniscoidea (Sands et al., 2008; Jørgensen et al., 2011), néanmoins d'autres études n'infèrent pas la monophylie de cette super-famille (Nichols et al., 2006; Jørgensen et al., 2011), tandis que les arthrotardigrades sont vraisemblablement un groupe paraphylétique en accord avec les données moléculaires publiées (Jørgensen et al., 2010; Guil and Giribet, 2012). La phylogénie de ce groupe n'est pas solidement fixée et nécessite davantage d'échantillonnages et de séquençages d'ADN, spécialement pour le groupe paraphylétique des arthrotardigrades afin d'avoir la résolution suffisante pour éclaircir les relations au sein de ces taxons.

4. Paléontologie et datation moléculaire du phylum Tardigrada

a. Une possible origine marine

L'histoire évolutive et l'écologie des tardigrades n'est pas entièrement comprise. L'étude de l'évolution de la cryptobiose chez les tardigrades et de leur terrestrialisation (la colonisation des environnements terrestres et d'eau douce) pourrait fournir de nouvelles informations sur l'évolution des panarthropodes et des tardigrades. Leur étude pourrait aider à comprendre les événements qui ont conduit à l'émergence de la vie continentale.

La prévalence des tardigrades terrestres dans la littérature descriptive est probablement due à des raisons d'accessibilité plutôt qu'à une réelle prévalence. Il ne fait pas de doute que de

nombreuses espèces marines restent encore à découvrir. En effet, bien que ce ne soit pas prouvé, les tardigrades pourraient prendre leur origine évolutive dans l'environnement marin d'après des données de fossiles marins datant du mi-Cambrien ($\sim 514 \pm 1.0$ Millions d'Années). Ce fossile provient d'une période durant laquelle la colonisation terrestre par les panarthropodes s'est probablement réalisée (Maas and Waloszek, 2001; Rota-Stabelli et al., 2013; Guidetti and Bertolani, 2018). Dans ce fossile du type « Orsten », la phosphatation des surfaces cuticulaires a permis de conserver des microfossiles de larves ressemblant à des tardigrades aux stades les plus précoces. Les 4 larves retrouvées possédaient 3 paires de pattes seulement (au lieu de 4 chez les tardigrades) avec 2 griffes aux extrémités. Cela pourrait concorder avec le fait que les hétérotardigrades (appelés larves) possèdent 2 griffes au lieu de 4 aux extrémités. Bien qu'il soit impossible d'affirmer avec certitude que ces organismes soient des tardigrades, ils pourraient être un potentiel groupe souche des tardigrades, maintenant éteint. La localisation marine du fossile peut suggérer que les tardigrades n'avaient pas encore colonisé les continents à cette période, alors que les panarthropodes l'avaient probablement déjà fait ($\sim 510\text{--}471$ MA) (Rota-Stabelli et al., 2013). Ainsi, la colonisation du milieu terrestre par les tardigrades a pu avoir lieu dans un second temps, en même temps que les nématodes et onychophores (~ 442 MA). En résumé, elle pourrait avoir eu lieu au Silurien - début du Dévonien, à la suite de la colonisation terrestre des plantes et des panarthropodes (Rota-Stabelli et al., 2013). Ces hypothèses restent sujettes à discussion et seule la découverte de davantage de fossiles permettrait une datation plus précise de la radiation des ecdysozoaires et de leur sortie de l'environnement marin.

b. Adaptation à la vie terrestre

Si l'on considère que les tardigrades sont originellement marins, l'une des pressions de sélection initiale pour coloniser les terres fut probablement la nécessité de supporter le stress hydrique, les fortes concentrations salines, les températures glaciales et les rayonnements solaires notamment dans les zones intertidales et côtières, où l'environnement alterne entre zones sèches et inondées au gré des marées. De manière plus

générale, le passage de l'océan à la terre pour les ecdysozoaires a conduit à l'émergence d'adaptation aux changements environnementaux rapides chez certains de ces organismes. Pour faire face à ces conditions, ils ont pu développer des mécanismes de résistance aux conditions extrêmes et notamment grâce à la forme cryptobiotique. Cette innovation évolutive pourrait avoir eu lieu avant la colonisation effective de l'environnement terrestre, dans les zones intertidales. En effet, les tardigrades marins *Echinoscoïdes sigismundi* et *Styraconyx haploceros*, vivants dans les zones intertidales présentent une haute tolérance à la déshydratation complète grâce à leur capacité cryptobiotique, tandis que les espèces exclusivement marines ne peuvent entrer en cryptobiose (Jørgensen and Møbjerg, 2015).

Enfin, la nécessité de tolérer ces changements brusques d'environnements a pu, en plus de développer la capacité de cryptobiose, permettre le développement d'un ensemble d'innovations évolutives pour réparer les dommages causés par les conditions environnementales défavorables. Et de manière intéressante, la tolérance à la dessiccation semble être en corrélation avec leur capacité à survivre à des doses extrêmes de rayonnements ionisants.

II. La tolérance aux conditions extrêmes : le cas particulier de la dessiccation chez les tardigrades

A. Adaptation aux conditions extrêmes et cryptobiose

La majorité des espèces décrites provient du milieu terrestre, au niveau des prairies, mares, cours d'eau, forêts et sédiments. Malgré leur présence terrestre, les tardigrades doivent toujours être entourés d'une fine pellicule d'eau pour être actifs et sont ainsi considérés comme des animaux aquatiques. Dans cette multitude d'habitats, certains offrent des conditions abiotiques stables et protégées comme les sédiments et l'humus des forêts, tandis que d'autres donnent lieu à des variations importantes de température et d'humidité

comme les mousses et les lichens sur les arbres. Dans ces milieux plus instables, il est nécessaire de posséder des mécanismes particuliers pour survivre à ces variations.

a. L'anhydrobiose pour s'adapter à la dessiccation

Pour faire face à l'absence d'eau dans leur habitat, les tardigrades peuvent adopter une forme déshydratée inactive. Cette forme de déshydratation extrême (ou dessiccation) porte le nom d'anhydrobiose et semble être toujours caractérisée par l'arrêt complet du métabolisme, ou tout du moins à un niveau indétectable. Les tardigrades possédant cette capacité prennent une forme de tonneau (« tun shape ») et perdent la majeure partie de l'eau (**Figure 5**) qu'ils possèdent dans leur organisme au niveau intra et extra-cellulaire ($<0,1\text{g H}_2\text{O.g}^{-1}$ de matière sèche ou $<10\%$ de la masse hydrique), ce qui équivaut à une humidité relative de l'air de 50% à 20°C (Alpert, 2005). Le seuil de 10% de masse hydrique semble marquer la dessiccation extrême, étant donné que c'est à ce taux qu'il n'y a plus assez d'eau pour former une monocouche de molécules d'eau autour des macromolécules, inhibant ainsi toute réaction enzymatique et entraînant *de facto* l'arrêt du métabolisme (Billi and Potts, 2002). Enfin, le phénomène d'anhydrobiose peut être défini par la capacité à se déshydrater complètement, en équilibre avec un air qui est modérément à extrêmement sec, puis avoir la capacité de reprendre une activité normale après réhydratation (Alpert, 2006).

b. Adaptation aux changements environnementaux extrêmes : la cryptobiose

De manière plus générale, cette forme extrême de quiescence n'est pas seulement spécifique au manque d'eau. Elle a été nommée cryptobiose et a été introduite par Keilin en 1959 (Keilin, 1959; Clegg, 2001). Il la définit comme « l'état d'un organisme qui ne montre aucun signe visible de vie et dont l'activité métabolique est difficilement mesurable ou atteint un état d'arrêt réversible ». L'induction et la maintenance de ce processus de survie est liée à des stimuli environnementaux externes.

Ce terme générique s'applique à différentes stratégies de survie aux conditions extrêmes que peuvent être la dessiccation, les températures glaciales ou les fortes variations de salinité. La forme cryptobiotique prend alors le nom d'anhydrobiose, de cryobiose ou d'osmobiose. D'autres formes en réponse au manque d'oxygène ou au contact avec des molécules environnantes toxiques semblent exister et portent le nom d'anoxybiose et de chimiobiose, mais les informations scientifiques sont manquantes à leur sujet. Les capacités cryptobiotiques des tardigrades ne sont pas limitées à un stade de développement précis, mais plutôt présentes durant toutes les étapes du cycle de vie des tardigrades possédant cette adaptation. Cela en fait des holo-cryptobiontes à l'instar de certains nématodes et des rotifères bdelloïdes, en distinction d'autres animaux dont les capacités cryptobiotiques sont restreintes à des stades très spécifiques du développement comme chez certaines larves d'insectes ou de crustacés (Jönsson, 2005; Rebecchi et al., 2007). Le cycle de vie des tardigrades cryptobiotiques consiste en des alternances entre des périodes actives de croissance et de reproduction, interrompues par des périodes d'inactivité métabolique totales imposées par les conditions environnementales hostiles. La cryptobiose se pose alors comme une réponse rapide à des changements environnementaux soudains et une manière d'échapper à des conditions abiotiques temporaires non propices à la vie sans avoir à fuir géographiquement ces conditions. Il est à noter que les conditions d'anhydrobiose, de cryobiose et d'osmobiose sont aussi retrouvées chez les tardigrades vivant dans les régions intertidales, d'où les tardigrades pourraient avoir commencé leur conquête du milieu terrestre. C'est donc chez les espèces intertidales, côtières et terrestres qu'on pourrait s'attendre à retrouver ces adaptations. Par ailleurs les tardigrades semi-terrestres peuvent généralement entrer dans leur forme cryptobiotique en moins de 30 minutes, tandis que les tardigrades vivant dans les zones intertidales peuvent passer dans cet état en seulement quelques secondes (Sørensen-Hygum et al., 2018).

c. Mécanismes biologiques de la cryptobiose

Le phénomène protecteur de cryptobiose implique un ensemble complexe de facteurs agissant aux niveaux structurels, physiologiques et moléculaires.

Au niveau structurel, les muscles viscéraux et somatiques participent à la formation de la forme de tonneau. Les muscles viscéraux réorganisent les organes internes, tandis que les muscles somatiques contractent le corps et les 4 paires de pattes des tardigrades (**Figure 7, A et B**). Les filaments protéiques musculaires, comme l'actine mais aussi d'autres protéines du cytosquelette permettent de stabiliser la structure du tonneau en rigidifiant le corps et stabilisant ainsi la forme déshydratée de l'animal (Møbjerg and Neves, 2021).

L'aspect physiologique des tardigrades est également altéré, notamment par l'arrêt des processus liés à la sénescence, réduisant ainsi le temps biologiquement actif des tardigrades sans affecter, en théorie, leur horloge biologique et leur espérance de vie (S. Hengherr et al., 2008). Ce phénomène est appelé effet « Belle aux Bois Dormant » (ou « Sleeping Beauty » effect) et a été étudié chez les tardigrades et les rotifères (Ricci and Covino, 2005). En second lieu, l'absence d'activité métabolique permet de survivre sans consommer d'énergie, ni d'avoir le besoin de se nourrir, ce qui est un avantage considérable quand les conditions environnementales ne sont pas propices pour une longue durée. Néanmoins l'étape de réhydratation nécessite de l'énergie, car des processus actifs de réparation des composants cellulaires doivent être mis en place à cette étape cruciale. Cette énergie est probablement puisée dans les cellules de stockage des tardigrades comme le suggère la diminution de leur volume après un cycle d'anhydrobiose (Jönsson and Rebecchi, 2002). Le phénomène de cryptobiose en réponse à la dessiccation est illustré dans la **figure 6**.

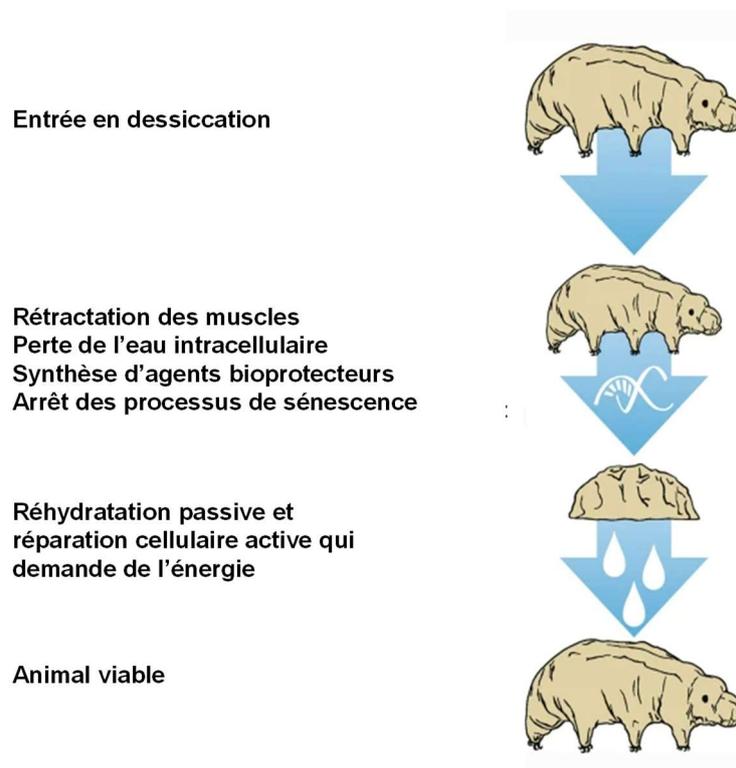


Figure 6 : Le processus de cryptobiose consiste en une dessiccation concomitante avec des adaptations biochimiques et physiologiques. La sortie de la cryptobiose implique des systèmes de réparation des composants endommagés pour permettre le retour à la vie normale. Image modifiée (Schill and Hengherr, 2018).

Il est intéressant de noter que malgré la possibilité de rester théoriquement pendant de très longues périodes à l'état cryptobiotique, cela n'assure pas forcément une survie à l'animal. Le record de survie à l'état cryptobiotique est de 20 ans en conditions de laboratoire (Jørgensen et al., 2007) et 30 ans en conditions de congélation (Tsujimoto et al., 2016). Il a été proposé que si la quantité de dommages accumulés durant la période cryptobiotique excède la capacité énergétique dont a besoin le tardigrade pour réparer ces mêmes dommages (Rebecchi et al., 2006), alors il ne peut pas survivre à la réhydratation, imposant ainsi une limite de temps à la cryptobiose (Schill and Hengherr, 2018) (Rebecchi et al., 2006).

Au niveau moléculaire, la déshydratation impliquée dans la cryptobiose est a priori délétère pour le maintien de l'intégrité cellulaire et de l'information génétique qu'elle contient, et

continue, surtout au moment de la réhydratation, à causer des dommages au niveau cellulaire. Normalement, la diminution drastique de l'eau intracellulaire modifie fortement de nombreux paramètres physiologiques tels que le pH, l'osmolarité et l'augmentation concentration en espèces réactives de l'oxygène (ERO) empêchant le fonctionnement normal des protéines, changeant leur conformation et induisant ainsi leur agrégation. De plus, l'absence d'eau empêche le fonctionnement normal des systèmes de réparation de l'ADN, nécessaires pour réparer les dommages induits par l'accumulation d'ERO durant la cryptobiose (Neumann et al., 2009; Giovannini et al., 2022).

Un ensemble d'agents bio-protecteurs entrent alors en jeu au niveau moléculaire pour répondre à ces conditions génotoxiques et protéotoxiques durant la cryptobiose. Ils seront développés plus en détail dans la partie II.C (Mécanismes de tolérance à la dessiccation chez les tardigrades).

d. Survie non cryptobiotique chez les tardigrades

La cryptobiose est une réponse physiologique à un changement environnemental soudain qui entraîne l'arrêt quasi-total du métabolisme. Certains tardigrades présentent aussi des formes d'adaptation différentes, l'enkystement et la cyclomorphose, permettant de répondre à des conditions défavorables de manière saisonnière.

i. L'enkystement

L'enkystement a été décrit chez des tardigrades vivants dans l'eau douce, les mousses et les sédiments comme le tardigrade *Amphibolus volubilis* (Guidetti et al., 2008). Il comporte une série de changements morphologiques qui présentent des similarités avec le phénomène de mue observé chez les tardigrades, les tardigrades prenant une forme ovale, contractée, et un épaissement de l'enveloppe externe étant observé par accumulation de couches cuticulaires successives. De plus, il y a une modification de l'appareil bucco-pharyngé et des griffes de l'animal dont il finit par se délester (**Figure 7, C**). Cette forme est induite par le concours de conditions internes et externes. Son induction dépend de facteurs comme la

température ou le niveau d'oxygène disponible (Guidetti et al., 2011), mais aussi de l'état physiologique dans lequel se trouve le tardigrade qui possède des cycles saisonniers. Elle permet de survivre à des conditions délétères moindres comparées à la cryptobiose et surtout pour des durées bien plus limitées pour des raisons de disponibilité en énergie. En effet, dans l'état de kyste, le métabolisme n'est pas arrêté mais seulement ralenti et continue donc de consommer de l'énergie.

ii. La cyclomorphose

La cyclomorphose est sans doute limitée à un nombre très restreint d'espèces, et n'a été rapportée en détail que pour un eutardigrade marin, *Halobiotus crispae*. Sa morphologie change au cours des saisons de manière cyclique en passant par 4 phases distinctes, dont une phase d'hibernation appelée pseudosimplex 1 (**Figure 7, D**). Cette phase a une forme très similaire à celle de l'enkystement et confère une résistance aux fortes variations salines ou à la congélation (Halberg et al., 2008). De plus, il a été montré qu'elle permettait de tolérer des périodes d'indisponibilité en oxygène et les chocs thermiques causés par les températures estivales de certaines régions (Møbjerg et al., 2007). Ces adaptations permettent aux tardigrades de survivre à des changements environnementaux jusqu'à épuisement de leur énergie.

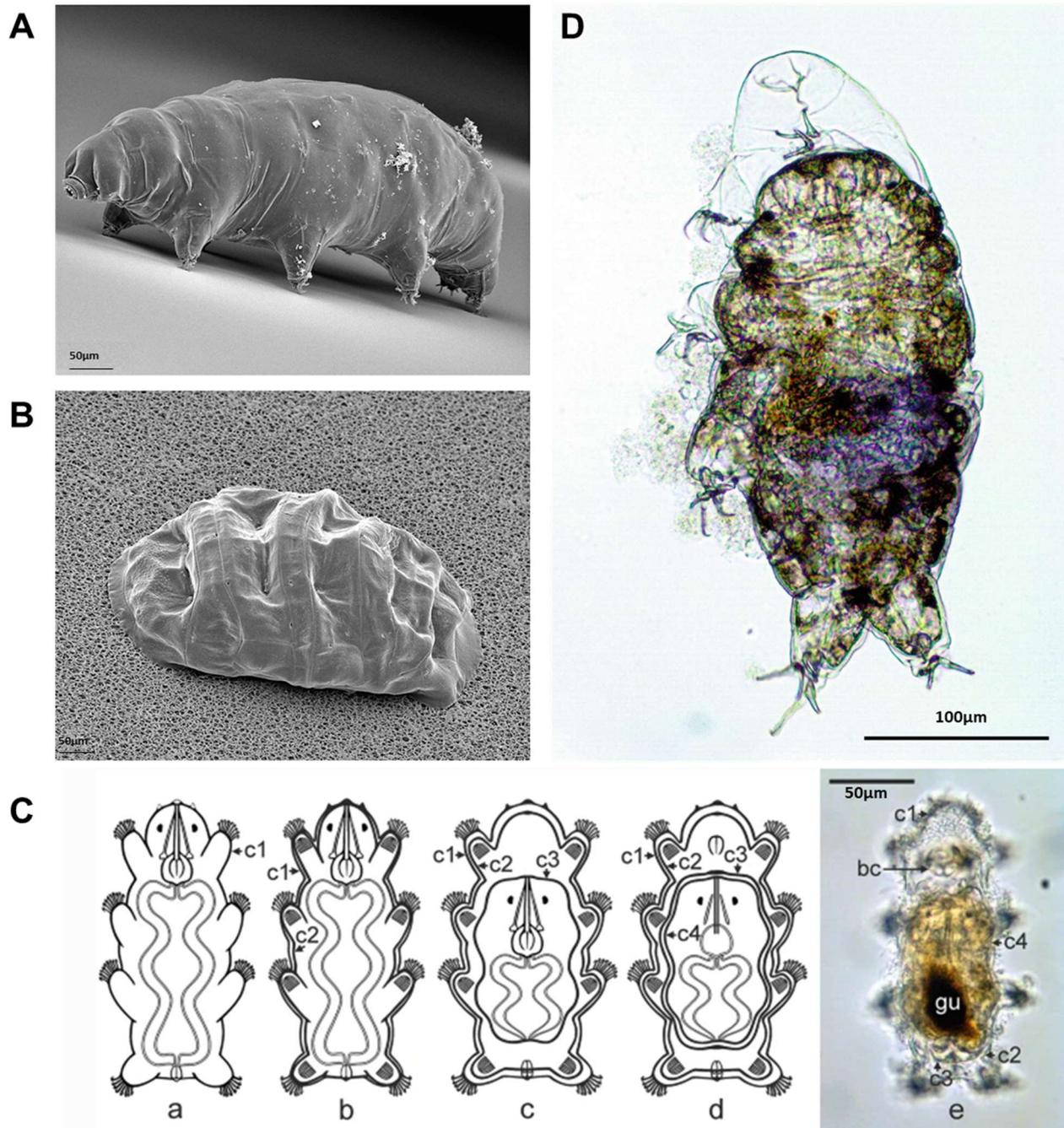


Figure 7 : Tardigrades sous forme anhydrobiotique, de kyste ou de cyclomorphose (A) Image au MEB d'un tardigrade actif de l'espèce *Paramacrobiotus richtersi* et **(B)** sa forme anhydrobiotique en tonneau (adapté de Schill and Hengherr, 2018). **(C)** Formation de kyste chez *Echiniscoides sigismundi*. **(a-d)** Représentation schématique de la formation de kyste. **(a)** Animal actif. **(b)** Animal en mue avec bouche et anus fermés. **(c)** Synthèse d'une seconde

couche cuticulaire c3 et retraction de l'animal dans 2 autres couches cuticulaires (c1 et c2) qui contiennent toutes deux des griffes. L'appareil bucco-pharyngé est maintenu. **(d)** Kyste avec 3 couches cuticulaires (c1 à c3). Le tardigrade s'est délésté des parties sclérifiées de son appareil bucco-pharyngé dans la couche c2. Une 4ème couche c4 entoure le tardigrade au plus près. **(e)** Photographie en microscopie optique de *E. sigsimundi* correspondant au schéma (adapté de Clausen et al., 2014). **(D)** *Halobiotus crispae* contracté au stade Pseudosimplex 1 de la cyclomorphose après exposition au CuCl₂ (adapté de Hygum et al., 2017; Schill and Hengherr, 2018). Abréviations : bc = bulb cuticle (bulbe cuticulaire); gu = gut (estomac).

iii. Résistance à l'état actif

Enfin, les tardigrades peuvent être très résistants aux stress environnementaux même à l'état actif. *H. crispae* mentionné précédemment résiste aux fortes variations de salinité également à l'état actif (Halberg et al., 2008). De nombreuses espèces de tardigrades semi-terrestres sont capables de résister à des températures allant jusqu'à -30°C sans congeler malgré des taux de refroidissement très rapides (Hengherr et al., 2009).

Les tardigrades peuvent également résister à l'état actif à de très hautes doses de rayonnements ionisants ou UV. Ces propriétés très importantes seront développées en détail dans la partie II.B.1 (Tolérance aux stress génotoxiques).

B. Données sur la survie des tardigrades à la dessiccation

La littérature concernant les expériences de dessiccation sur les tardigrades est très fournie et les conditions testées sont nombreuses. La plupart des espèces résistantes à la dessiccation décrites font partie de la classe des eutardigrades, mais il en existe aussi parmi les hétérotardigrades.

Dans cette partie, j'ai classé quelques exemples issus de la littérature illustrant la tolérance des tardigrades à la dessiccation (**tableau 2**). J'ai réalisé cette synthèse en classant les espèces par classe, ordre et super-famille dans le but d'avoir un support de discussion synthétique et de montrer l'étendue et la spécificité de cette tolérance au sein des différents groupes de tardigrades. Il est à noter que les études n'ont pas été réalisées par dans les mêmes conditions d'humidité relative, de température et les temps de dessiccation et de déshydratation sont très variables d'une étude à l'autre. Pour m'affranchir de ce biais, je ne discuterai que des différences de survie très significatives d'une espèce à l'autre. Les petites variations dans la survie (<10% de différence) ne seront pas discutées.

Tableau 2 : Études en lien avec la tolérance à la dessiccation chez les tardigrades. Le fond gris indique des tardigrades semi-terrestres et le fond bleu indique le seul tardigrade marin étudié.

Classification phylogénétique	Humidité relative	Température	Temps passé en dessiccation	Durée de la réhydratation	Taux de survie	Remarques	Auteur
Classe, Ordre, Super-famille							
<i>Hypsibius exemplaris</i>	25-30%	18,7 - 21,4°C	15h	Non indiquée	0%	(1)	Wright 1989
	Préconditionnement préalable à 85% HR pendant 150 ou 200 minutes puis dessiccation à 25-31% HR	18,7 - 21,4°C			- 150min de préconditionnement: 12,5% - 200 min de préconditionnement: 75%		
	10%	18°C	48h	24h	0%	(2)	Kondo et al. 2015
	Préconditionnement préalable à 95% HR pendant 24h puis dessiccation à 10% HR	18°C		24h	>90%		
<i>Acutuncus antarcticus</i>	Préconditionnement préalable à 80% HR pendant 4 h, 50% HR pendant 4 h puis 0-3% HR	15°C	48h	60 min	92,8 ± 9,0%	(3)	Giovannini et al. 2018
<i>Ramazzottius varieornatus</i>	33.8%	22°C	5 jours	24h	98,8 ± 2.5%		Horikawa et al. 2013
<i>Richtersius cf. coronifer</i>	50%	20°C	72h	Non indiquée	92 ± 4%	(4)	Westh et Ramløv, 1991
	Humidité ambiante	22°C	24h	24h	97 ± 5 %	(5)	Halberg et al. 2013
<i>Paramacrobotus richtersi</i>	85% HR (durée non indiquée) puis 35% HR pendant 48h	20 °C	48h	4h	100%		Hengherr et al. 2008
<i>Paramacrobotus tonollii</i>							
<i>Macrobotus sapiens</i>							
<i>Macrobotus kyoukenus</i>	Préconditionnement préalable à 80% HR pendant 4h puis 50% HR pendant 4h puis 0 à 3%	18 °C	48h	60 min	95.71 ± 7.07%	(6)	Cesari et al. 2022
<i>Milnesium inceptum</i> (anciennement <i>Milnesium tardigradum</i>)	58%	25°C	1h	Non indiquée	97,5%		Horikawa et Higashi, 2004
	52%				82,5%		
<i>Echneiscus testudo</i>	85% HR (durée non indiquée) puis 35% HR pendant 48h	20 °C	48h	4h	100%		Hengherr et al. 2008
<i>Echneiscus granulatus</i>							
<i>Echneiscoides sigismundi</i>	62%	22-23°C	48h	48h	95 ± 2%	(7)	Hygum et al. 2016
					92 ± 3%	(8)	Hygum et al. 2016

- (1) Préconditionnement nécessaire pour survivre une dessiccation à 25-30% HR
- (2) Préconditionnement nécessaire pendant 24h à 95% RH
- (3) L'HR à 0-3% a été réalisée à 20°C
- (4) Déshydratation dans du sable sous flux d'air
- (5) Traitement avec 0,1mM ou 1mM de DNP (2, 4-dinitrophenol) qui est un découpleur de la chaîne mitochondriale diminue drastiquement la survie :
- 4 ± 9 % (0.1 mM)
- 2 ± 4 % (1.0 mM)
- (6) Valeur de survie donnée à 24h post réhydratation
- (7) Déshydratation dans l'eau de mer (condition naturelle): activité retrouvée en moins de 30min après réhydratation
- (8) Déshydratation dans l'eau ultrapurifiée: incapacité de former un tonneau et activité retrouvée en 2h après réhydratation

La majorité des tardigrades évalués pour leur tolérance à la dessiccation sont des eutardigrades semi-terrestres, qu'ils soient de l'ordre Apochela ou Parachela.

De manière intéressante, le cas de *R. varieornatus*, très résistant à la dessiccation rapide sans pré-conditionnement (Horikawa et al., 2008), est décrit comme souvent soumis au manque d'eau dans son environnement naturel, ce qui pourrait suggérer que les tardigrades semi-terrestres très souvent exposés à la dessiccation soient plus résistants que les eutardigrades qui le seraient moins, comme *H. exemplaris* (Stone, 2020). En effet, *H. exemplaris*, qui fait partie de la même super-famille que *R. varieornatus*, nécessite un pré-conditionnement de plusieurs heures avec une humidité relative (HR) (>85%) pour supporter la dessiccation. On observe que plus la durée de préconditionnement augmente et plus sa survie augmente. La survie n'augmente plus au-dessus de 24h de préconditionnement. Ces données ont d'abord suggéré que *H. exemplaris* nécessitait de synthétiser des composés pour survivre à la dessiccation, et donc qu'un temps d'adaptation lui était indispensable. A l'inverse, il a été suggéré que *R. varieornatus* possédait de manière constitutive les composants nécessaires pour tolérer la dessiccation et entrer rapidement en anhydrobiose. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de mesure de l'expression des gènes chez les deux espèces en réponse à la dessiccation. J'aborderai cet aspect dans la partie suivante, qui concerne les voies de régulation régissant l'anhydrobiose (II.C.1).

Au sein des Macrobiotioidea (Eutardigrada, Parachela), seul *R. coronifer* a été soumis à une dessiccation sans pré-conditionnement. Il montre une forte survie à la dessiccation (>90%). Toutefois, les autres études réalisées chez cette super-famille ont toutes été réalisées avec un préconditionnement préalable, ainsi nous pouvons conclure sur leur forte tolérance à la dessiccation (100% de survie), mais pas sur la rapidité de la mise en place de cette tolérance. Chez les Milnesiidae, *M. inceptum* (Eutardigrada, Apochela) montre aussi une forte tolérance à la dessiccation sans préconditionnement.

Ces données indiquent que les eutardigrades sont très résistants à la dessiccation, au sein des Parachela et Apochela. Toutefois des différences existent parfois quant au "temps de préparation" nécessaire pour tolérer cette condition. Des différences peuvent d'ailleurs

exister au sein même d'une super-famille, comme l'illustre le cas de *R. varieornatus* et *H. exemplaris*. Toutefois, avec le temps adéquat, tout ces tardigrades résistent très bien à la dessiccation.

Chez les hétérotardigrades terrestres du genre *Echiniscus* (Heterotardigrada, Echniscoidea, Echiniscidae), un pré-conditionnement est suffisant pour tolérer complètement la dessiccation, indiquant que cette tolérance n'est pas restreinte à la classe Eutardigrada. Étonnamment, l'hétérotardigrade marin *E. sigismundi* (Echniscoidea, Echiniscoididae) peut aussi tolérer la dessiccation et se met en forme de tonneau. L'entrée en forme de tonneau est toutefois empêchée s'il subit la dessiccation dans l'eau ultra purifiée au lieu de l'eau de mer, mais sa survie n'est que peu impactée (Survie >90%). Cela indique que la forme tonneau n'est pas nécessaire chez cette espèce pour survivre à ce stress. À l'inverse, elle semble indispensable chez l'eutardigrade *R. coronifer* pour survivre à la dessiccation. Une hypothèse possible est que l'anhydrobiose aurait pu avoir évolué plusieurs fois chez les tardigrades ou, alternativement, que les processus fondamentaux qui sous-tendent la cryptobiose sont une caractéristique inhérente aux tardigrades et que ces processus ont ensuite été modifiés dans les différentes lignées. Chez les hétérotardigrades marins, cette forme ne semble pas nécessaire à leur survie à la dessiccation, tandis que chez les eutardigrades, elle semble l'être. Cette hypothèse est également soutenue par la forte tolérance à la dessiccation et la formation de tonneaux en réponse à la dessiccation chez l'arthrotardigrade marin *Styraconix haploceros* (données de survie non fournies) (Jørgensen & Møbjerg, 2015).

En conclusion, la capacité de tolérance à la dessiccation semble exister dans les deux classes de tardigrades, et passe sans doute par des mécanismes d'entrée en anhydrobiose différents en fonction de la classe, mais aussi de l'espèce. Toutes les espèces ne sont pas égales face au stress de dessiccation, et certaines comme *H. exemplaris* nécessitent un temps d'adaptation avec une HR intermédiaire pour survivre à des HR plus basses.

C. Mécanismes de tolérance à la dessiccation chez les tardigrades

Dans les parties précédentes, j'ai décrit succinctement l'étendue de la tolérance des tardigrades à la dessiccation. Toutefois cette forme passe par un ensemble d'acteurs moléculaires, parfois spécifiques aux tardigrades, qui leur permettent d'être tolérants et d'activer leur forme anhydrobiotique et de protéger leurs composants cellulaires.

1. Voies de signalisation régissant l'anhydrobiose

Les études sont peu nombreuses concernant la signalisation qui mène à l'entrée ou la sortie de la forme anhydrobiotique chez les tardigrades.

Suivant les espèces, il semble que l'entrée en anhydrobiose peut nécessiter ou non une forte modification de l'expression génique, ce qui pourrait suggérer l'existence de formes très variées de signalisation.

Chez *R. varieornatus*, qui est capable de résister à une déshydratation très rapide (Horikawa et al., 2008), les données transcriptomiques montrent de faibles variations de l'expression des gènes en réponse à l'anhydrobiose, suggérant que ce tardigrade exprime de manière constitutive un ensemble d'agents moléculaires indispensables pour la survie à la dessiccation. Les variations de concentrations en solutés intracellulaires, multipliées par 10 sur un très court laps de temps, perturbent normalement fortement les réactions biochimiques nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Il paraît alors en effet peu probable qu'une modification de l'expression génique puisse s'opérer sur un si court délai et avec de si forts changements de l'environnement biochimique intra- et extracellulaire pour permettre la synthèse d'agents nécessaires à la dessiccation.

H. exemplaris, espèce limnoterrestre, nécessite un pré-conditionnement de 24h avec une diminution progressive de l'humidité de l'air pour pouvoir entrer en anhydrobiose avec

succès. Pendant ce pré-conditionnement, *H. exemplaris* synthétise les agents moléculaires nécessaires à l'entrée en anhydrobiose comme le montrent la forte variation de l'expression génique en réponse à la dessiccation avec 1422 gènes surexprimés (~7,1% du total de gènes) contre 64 gènes (0,5% du total de gènes) en dessiccation rapide (30 minutes) et 307 gènes (~2,2% du total de gènes) en dessiccation lente (24h) pour *R. varieornatus* (Yoshida et al., 2017). Les mêmes observations sur les modifications de l'expression génique au cours de l'entrée en anhydrobiose ont été faites par Boothby et al. (Boothby et al, 2017) qui de plus a montré par des expériences d'interférence ARN que certains des gènes induits sont bien essentiels pour la survie à l'anhydrobiose. Il avait également été montré, par inhibition chimique de la transcription ou de la synthèse protéique (α -amanitine ou cycloheximide respectivement) chez *H. exemplaris*, que la survie de l'animal était significativement diminuée après réhydratation, supportant l'idée que la synthèse de nouveaux gènes est nécessaire à la survie à la dessiccation chez *H. exemplaris* (Kondo et al., 2015).

L'utilisation d'un inhibiteur des phosphoprotéines phosphatase 1 et 2A (PP1 et PP2A) empêche le bon déroulement de l'anhydrobiose chez *H. exemplaris* suggérant que ces dernières en sont des régulateurs importants. Pour le moment, la distinction entre les rôles de PP1 et PP2A reste à élucider (Kondo et al., 2019). Par ailleurs, la réalisation d'un phosphoprotéome au cours du temps pendant la phase de pré-conditionnement à l'anhydrobiose avec ou sans inhibition de PP1/PP2A montre une variation du profil de phosphorylation de la sous-unité catalytique PRKAA2 de l'AMPK. L'AMPK est une protéine clé de la régulation de l'homéostasie énergétique qui joue un rôle de senseur énergétique (Hardie and Lin, 2017). Son absence de déphosphorylation est corrélée avec l'inhibition de l'anhydrobiose et l'utilisation d'un inhibiteur de l'AMPK affecte la survie après anhydrobiose (Kondo et al., 2019). Chez de nombreux organismes PP2A déphosphoryle l'AMPK suggérant que l'anhydrobiose passe par PP2A et l'AMPK (Joseph et al., 2015; Li et al., 2018). Toutefois la plupart des études montrent que la déphosphorylation de l'AMPK entraîne son inactivation (Wang et al., 2010; Guo et al., 2017; Li et al., 2018) alors que l'inverse est observé ici dans le cas de l'anhydrobiose. Cette divergence pourrait provenir d'une régulation de la voie de l'AMPK unique au tardigrade qui passerait au cours de l'anhydrobiose par la

déphosphorylation d'acides aminés différents que ceux observés habituellement (Arakawa, 2022).

Par ailleurs, le profil de phosphorylation de protéine TRPM (pour « Transient receptor potential cation channel subfamily M), est affecté par l'entrée en anhydrobiose mais pas par l'inhibition de PP1/PP2A suggérant que ce canal ionique pourrait jouer le rôle de senseur en amont de PP1/PP2A (Kondo et al., 2019). A l'inverse, le profil de phosphorylation de la protéine STAT5A (pour "Signal Transducer and Activator Of Transcription 5A") est affecté par l'inhibition de PP1/PP2A suggérant un rôle potentiel de ce régulateur transcriptionnel (Kondo et al., 2019).

Dans l'espoir d'activer chimiquement l'AMPK, le pré-traitement avec le composé D492 a permis d'obtenir une survie dans des conditions de préconditionnement normalement trop brutales chez *H. exemplaris*. Toutefois, il a été réalisé plus tard que la protéine ciblée par le composé D492 n'est pas conservée chez *H. exemplaris* et donc que le composé D492 n'activait pas l'AMPK, le mécanisme impliqué restant donc à éclaircir (Kondo et al., 2020). Néanmoins, la découverte d'un composé permettant de diminuer le pré-conditionnement pourrait être un outil de choix pour élucider les mécanismes de signalisation régissant ce processus.

2. Défenses antioxydantes et élimination des radicaux libres

a. Voies usuelles de l'élimination des radicaux libres

- i. Surexpression et expansion des protéines de lutte contre le stress oxydant

En 2017, Yoshida et al. publient une analyse transcriptomique comparative en réponse à la dessiccation chez les eutardigrades *H. exemplaris* et *R. varieornatus*. L'analyse des gènes différentiellement exprimés fait état de la surexpression de gènes de la voie de biosynthèse du glutathion et du métabolisme du tryptophane, tous deux étant impliqués dans la lutte

contre le stress oxydatif. On retrouve notamment la surexpression de la Glutathion S-transférase (GST), la Superoxyde Dismutase (SOD) et la catalase (Yoshida et al. 2017). Ces données consolident alors celles déjà acquises en comparant des données EST (marqueur de séquence exprimée, ou « expressed sequence tag ») de *M. inceptum* et *H. exemplaris*, qui indiquent l'existence d'une activité antioxydante chez ces deux tardigrades (Förster et al. 2012). Il a également montré qu'il y a une expansion de la SOD chez 4 espèces de tardigrades (*R. varieornatus*, *H. exemplaris*, *E. sigismundi*, *R. coronifer*) en comparaison d'organismes comme *C. elegans*, *D. melanogaster* ou *H. sapiens* (Kamilari et al., 2019).

Sur des spécimens de *Paramacrobiotus richtersi* actifs ou en dessiccation, la mesure de l'activité d'enzymes du système de défense antioxydant montre une augmentation significative de l'activité de la SOD et de la glutathione peroxydase. Les auteurs ont également montré une augmentation du niveau de peroxydation des lipides chez les animaux en anhydrobiose, qui pourrait être l'une des causes létales parfois observée après une longue pause à l'état anhydrobiotique (Rizzo et al. 2010). De la même manière, la mesure de l'activité enzymatique de la catalase augmente significativement chez *Paramacrobiotus spatialis* durant la dessiccation pour finalement diminuer pendant la réhydratation. Chez *A. antarcticus*, cette même étude a montré que l'activité de la SOD diminuait pendant la dessiccation pour réaugmenter pendant la réhydratation (Giovannini et al., 2022b). Les résultats obtenus chez *P. spatialis* concordent avec le fait que l'inhibition de l'expression de la catalase par interférence par ARN affecte la motilité des animaux après la réhydratation et qui prennent plus de temps à récupérer. Les mêmes types d'expérience ciblant le gène de la glutathione peroxydase, surexprimé chez cette espèce en réponse à la dessiccation, altère la survie des animaux pendant la dessiccation. Et l'inactivation de la glutathione réductase altère la motilité des individus de manière similaire à ce qui a été observé avec la catalase. Il a été suggéré que la catalase et la glutathione réductase étaient importantes dans le processus de réhydratation après l'anhydrobiose. L'accumulation d'ERO en raison de l'absence de ces enzymes aurait pour conséquence de demander plus de temps à l'animal pour récupérer, le temps que d'autres systèmes de détoxification des ERO puissent éliminer ces molécules (Giovannini et al., 2022a).

La présence en plusieurs exemplaires de nombreuses protéines de défense contre le stress oxydatif, dans le phylum tardigrada souligne l'importance de la gestion de ce stress durant l'anhydrobiose. Toutefois des réponses antioxydantes variées sont observées en fonction de l'espèce considérée, comme entre *P. spatialis* un tardigrade terrestre des régions tempérées et *A. antarcticus*, tardigrade majoritairement d'eau douce des régions polaires. Ce qui suggère que les environnements particuliers de chacun de ces animaux ont pu conduire à des spécialisations dans les stratégies de défense antioxydante.

ii. Une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène
?

Les péroxysomes sont des organelles ubiquitaires dans les cellules eucaryotes et sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques et fonctionnent en coordination avec les mitochondries. Ces organelles sont des sources de production d'ERO mais possèdent également des systèmes de détoxification contre le stress oxydant et participent au maintien de la balance redox. De manière intéressante, Hashimoto et al. 2016 ont observé que *R. varieornatus* a perdu l'ensemble des gènes de β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes. L'analyse du génome de *H. exemplaris* a également permis de conclure à une absence des gènes de cette voie (Yoshida et al., 2017). Dans ces deux espèces, l'absence de la voie de la β -oxydation peroxysomale, génératrice de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pourrait mener à l'utilisation seule de la β -oxydation mitochondriale qui ne produit pas d' H_2O_2 . Ainsi l'absence de production d' H_2O_2 durant le métabolisme des acides gras pourrait permettre de préserver les capacités antioxydantes de l'animal pour répondre au stress oxydatif généré par la dessiccation (Hashimoto et al., 2016). Kamilari et al. 2019 ont également décrit les absences et présences des gènes de protéines peroxysomales chez différentes espèces de tardigrades et conclu que la voie de biogenèse par fission serait absente et que les taux de ROS générés par les peroxysomes de tardigrades pourraient être plus faibles (Kamilari et al., 2019). En effet, ils rappellent que chez *C. elegans*, l'inactivation de certaines protéines peroxysomales peut diminuer le taux de ROS et rallonger la durée de vie (Van Veldhoven and Baes, 2013).

b. Protéines antioxydantes spécifiques aux tardigrades

Afin d'identifier de nouveaux candidats importants dans la dessiccation et la résistance aux stress oxydants, Yoshida et al. ont irradié *R. varieornatus* aux rayonnements UV de faible longueur d'onde (UVC) pour générer des ERO (Yoshida et al., 2022). Ils ont ensuite comparé ces données à celles du transcriptome en réponse à la dessiccation lente, censée induire une plus forte réponse transcriptomique chez cette espèce (Yoshida et al., 2017). Ainsi ils ont identifié une peroxydase unique aux tardigrades et dépendante du manganèse (AMNP ou « Anhydrobiosis-related Mn-dependent peroxidase ») dont le rôle a été identifié par analyse structurale et mesure de son activité enzymatique *in vitro* en présence de Mn^{2+} . Cette protéine n'est pas soluble à haute température, à l'inverse de nombreuses protéines impliquées dans l'anhydrobiose chez les tardigrades. La fusion de de l'AMNP à la GFP a permis d'observer une localisation de la protéine dans l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi est un organelle essentiel au stockage du manganèse, qui contient une concentration en manganèse strictement contrôlée (Das et al., 2019; Yoshida et al., 2020), et est impliqué dans la réponse au stress oxydatif. Le manganèse joue le rôle de co-facteur d'enzymes de détoxification des EROs (Jiang et al., 2011). Toutefois, son rôle dans l'anhydrobiose n'est pas connu et il serait intéressant de mieux comprendre son implication précise dans la résistance à la dessiccation. Des cellules humaines transfectées avec l'AMNP taggée avec la GFP et soumises à l'eau oxygénée (H_2O_2) montrent une survie améliorée, indiquant que cette protéine confère une protection contre le stress oxydant, comme le suggère son activité de peroxydase (Yoshida et al., 2022).

L'AMNP est présente chez tous les tardigrades dont les génomes sont disponibles, à la fois chez les eutardigrades et les hétérotardigrades.

3. Protéines chaperonnes

Parmi les pistes étudiées pour expliquer les résistances des tardigrades aux changements brusques de conditions environnementales, les protéines de chocs thermiques sont des candidates intéressantes. En effet les protéines telles que Hsp70 sont très fortement induites

au niveau transcriptomique en cas de cryptobiose chez le tardigrade *M. inceptum*. Il montre une induction significative de l'isoforme 2 de la protéine Hsp70 en réponse à l'entrée en forme cryptobiotique (Schill et al., 2004). Deux autres isoformes (1 et 3) sont inhibées en réponse à la dessiccation et sont surexprimées après réhydratation. L'isoforme 2, pourrait néanmoins avoir un rôle protecteur lors de l'entrée dans le stade de dessiccation. Cela suggère que les isoformes 1 et 3 sont plutôt impliquées dans la résistance post-dessiccation plutôt que pendant la dessiccation. Ils pourraient éventuellement accompagner la réparation des structures cellulaires endommagées lors de la dessiccation.

Jönsson and Schill, 2007 ont montré par Western-Blot que Hsp70 était induite post-dessiccation après réhydratation de *R. coronifer* anhydrobiotique, mais ils observent une diminution de l'expression pendant la dessiccation, comme les isoformes 1 et 3 de l'étude mentionnée précédemment. Néanmoins (Ramløv and Westh, 2001) ont montré chez cette même espèce l'induction d'une protéine d'environ 71kDa en réponse à la dessiccation qui pourrait être une isoforme de Hsp70 pendant la dessiccation.

Enfin chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les protéines de choc thermique telles que Hsp104 chez *S. cerevisiae* sont nécessaires à la tolérance à la dessiccation sur court terme, mais il a également été montré qu'un sucre appelé le tréhalose intervenait pour tolérer la dessiccation sur le long terme (Tapia and Koshland, 2014).

4. Synthèse de bioprotectants et protéines intrinsèquement désordonnées

La plupart des cellules et organismes vivants ne peuvent survivre en l'absence d'eau, car en condition de dessiccation les constituants biologiques des cellules tels que l'ADN, l'ARN, les protéines et les membranes sont dénaturés et ne peuvent remplir leur rôle biologique normal. Cela entraîne pour la plupart des organismes la mort cellulaire et, à plus long terme, de l'organisme. Un ensemble de mécanismes biologiques utilisant des agents bioprotecteurs sont proposés pour expliquer la résistance des tardigrades à ces phénomènes induits par la dessiccation.

a. Le tréhalose

i. Un sucre présent chez de nombreuses espèces résistantes à la dessiccation

L'eau éliminée par l'organisme pendant la cryptobiose est remplacée, chez certaines espèces de tardigrades, par le tréhalose, un disaccharide non réducteur. Ce sucre est retrouvé à fortes concentrations chez de nombreux organismes anhydrobiotiques comme les nématodes, les kystes embryonnaires de certains crustacés et chez les levures. En 1970, Clegg montre l'importance du tréhalose chez les embryons kystiques d'*Artemia salinia*, une crevette vivant dans les environnements saumâtres, ses embryons pouvant rester en anhydrobiose et survivre pendant plusieurs décennies sans eau (Crowe, 2008). Chez le nématode *Aphelenchus avenae* jusqu'à 15% de la masse sèche de l'organisme peut être imputée au tréhalose (Crowe and Madin, 1975). De plus, en réponse aux températures glaciales, on observe chez le collembole *Onychiurus arcticus*, une augmentation significative du tréhalose dans l'organisme pendant la dessiccation partielle induites par les très basses températures (Worland et al., 1998). Ce composé est également retrouvé de manière extensive dans le règne végétal chez les plantes résistantes à la dessiccation, comme chez certains chlorophytes, algues vertes, mousses et hépatiques (Koster and Leopold, 1988; Lunn et al., 2014).

ii. Mécanismes protecteurs proposés

Il a été montré *in vitro* que le tréhalose pouvait stabiliser l'état natif des protéines tout en préservant les membranes lipidiques pendant la déshydratation (Crowe et al., 1998).

En considérant que cet effet protecteur soit similaire *in vivo* deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme protecteur du tréhalose :

- L'hypothèse du remplacement de l'eau ou « water replacement hypothesis » suggère que le tréhalose pourrait agir en tant que substituant structural de l'eau, et capable

de créer des liaisons hydrogènes avec les macromolécules et les structures cellulaires pendant la déshydratation, aidant ainsi à la préservation de la structure native des protéines (Crowe, 2002)

- L'hypothèse de la vitrification du tréhalose est également avancée, sans exclure la première. Le tréhalose en se concentrant en l'absence d'eau pourrait atteindre un état vitrifié et amorphe qui prévient les mouvements moléculaires, empêchant ainsi les réactions biochimiques délétères et par conséquent empêche la dénaturation des constituants cellulaires (Yagi-Utsumi et al., 2021).

iii. Tous les tardigrades ne font pas usage du tréhalose pour répondre à la dessiccation

Chez l'Eutardigrade *Richtersius coronifer*, une espèce de la famille des Macrobiotidae (ordre Parachela), on observe une augmentation significative du tréhalose en réponse à la dessiccation (jusqu'à 2,3% de la masse sèche du tardigrade) (Westh and Ramløv, 1991). En mesurant les niveaux de tréhalose de 5 espèces des familles Macrobiotidae (genre *Macrobiotus*), 1 de Milnesiidae (*Milnesium inceptum*, ordre Apochela) et 2 d'Echiniscidae (genre *echiniscus*, ordre Echiniscoidea), une augmentation du tréhalose durant l'anhydrobiose n'est détectée que chez les Macrobiotidae tandis que chez l'Eutardigrade, aucune trace de tréhalose n'est détectée tant à l'état actif que cryptobiotique. Chez les Echiniscidae testés, aucune augmentation du tréhalose n'est observée après dessiccation, bien que du tréhalose soit déjà présent à l'état actif. Chez les 5 Macrobiotidae, la corrélation nette entre l'accumulation de tréhalose et l'induction de l'anhydrobiose, suggère un rôle protecteur du disaccharide en réponse aux stress induits par la dessiccation (Hengherr et al. 2008).

Certaines espèces de tardigrades pourraient donc utiliser le tréhalose pour se prémunir des effets délétères de la dessiccation (Macrobiotidae), tandis que chez d'autres son rôle ne semble pas décisif pour y répondre étant donné l'absence de variation de la concentration en réponse à la dessiccation (Echiniscoidea). Néanmoins, il y a une absence complète de tréhalose chez des espèces comme les Milnesiidae pourtant résistants à la dessiccation (S.

Hengherr et al., 2008). De plus, les niveaux de tréhalose détectés chez les tardigrades varient selon l'espèce de 0% à 2,9%, mais restent faibles en comparaison d'autres espèces anhydrobiotiques comme *Polypedilum Vanderplanki*, qui possède des concentrations qui avoisinent les 15-20% de tréhalose rapporté à la masse sèche (Okuda, 2006; S. Hengherr et al., 2008; Ingemar Jönsson and Persson, 2010). Ceci suggère que l'augmentation de tréhalose n'est sans doute pas suffisante, pour expliquer, à elle seule, leur capacité d' anhydrobiose.

Il est par ailleurs intéressant de noter que le tréhalose est présent chez les Macrobiotidae et Echiniscidae mais pas chez les Milnesiidae alors que les Macrobiotidae et Milnesiidae sont plus proches évolutivement entre eux (eutardigrades) que des Echiniscoidea (hétérotardigrades). Cela pourrait suggérer que la capacité à synthétiser du tréhalose soit apparue à différentes reprises dans l'embranchement Tardigrada sur des ancêtres différents chez les Macrobiotidae et les Echiniscidae. On pourrait également faire l'hypothèse que cette capacité fut initialement présente chez l'ancêtre commun des 3 familles, mais qu'elle ait été perdue par les Milnesiidae, et plus généralement chez les espèces de l'ordre Apochela dont les Milnesiidae sont les seuls représentants (Hengherr et al. 2008; Hara et al., 2021).

iv. Le tréhalose fonctionne de manière synergique avec des protéines protectrices uniques aux tardigrades

Chez *H. exemplaris*, toutes les enzymes importantes de la chaîne de biosynthèse du tréhalose sont retrouvées. L'étude de l'expression des gènes codant pour ces enzymes ne montre pas de surexpression des enzymes de synthèse du tréhalose (Tps1 ou TPP) en réponse à la dessiccation. Toutefois, la dessiccation induit une diminution systématique de l'expression des tréhalases qui sont des enzymes de dégradation du tréhalose, ce qui suggère que *H. exemplaris* a pu évoluer pour accumuler de faibles niveaux de tréhalose durant la déshydratation par inhibition de la dégradation plutôt que par la synthèse. Ces observations ont mené à se demander si le tréhalose pouvait éventuellement avoir un rôle synergique ou additif avec d'autres molécules protectrices durant l'anhydrobiose. Ainsi, il a été montré *in vitro* que le tréhalose fonctionnait de manière synergique avec une protéine intrinsèquement désordonnée unique aux tardigrades appelée CAHS D. En soumettant *in vitro* la lactate

déshydrogénase, enzyme très sensible à la dessiccation, à un test de dessiccation en présence de ratios spécifiques de CAHS D : tréhalose, un effet protecteur significatif est observé. Ce même résultat protecteur est observé *in vitro* en mesurant la dégradation d'ARNs soumis à la dessiccation mis en présence de ces deux composés à des ratios spécifiques. Une tolérance accrue de *S. cerevisiae* modifiées génétiquement pour exprimer le tréhalose et la CAHS D est également observée en réponse à la dessiccation. Enfin, en testant d'autres types de CAHS de tardigrades en présence de tréhalose chez la levure, la tolérance accrue à la dessiccation est également retrouvée (Nguyen et al., 2022).

Ces résultats montrent que le tréhalose n'est pas suffisant pour expliquer à lui seul la tolérance à la dessiccation chez certains tardigrades, mais qu'il peut parfois avoir un rôle synergique avec d'autres molécules protectrices comme les protéines désordonnées de tardigrades. En ce sens, je discuterai dans le paragraphe suivant sur le fonctionnement des protéines intrinsèquement désordonnées comme les LEA mais aussi les protéines désordonnées uniques aux tardigrades, dont les CAHS font partie.

b. Les protéines intrinsèquement désordonnées

Le fait qu'un certain nombre d'animaux qui entrent en anhydrobiose ne possèdent pas de tréhalose, ni les chaînes de biosynthèse nécessaires pour le produire, comme les rotifères bdelloïdes (Lapinski and Tunnacliffe, 2003) ou certains tardigrades comme les Milnesiidae, suggère que d'autres mécanismes peuvent entrer en jeu pour résister à la dessiccation. Ces observations ont donné lieu à de nombreuses études pour trouver quelles molécules pouvaient expliquer l'anhydrobiose. C'est ainsi qu'a émergé le paradigme des petites protéines intrinsèquement désordonnées.

i. Les protéines LEA ("Late Embryogenesis Abundant")

Les LEA sont de petites protéines appartenant à la famille des hydrophilines, un groupe de protéines très hydrophiles, intrinsèquement déstructurées, dont la composition en acides aminés est riche en petits acides aminés (Gly, Ala, Ser) (Battaglia et al., 2008), ce qui favorise

la flexibilité de leur structure tertiaire et donc pourrait être la raison qui leur permet de continuer leur activité même dans des conditions qui dénatureraient la plupart des protéines (Garay-Arroyo et al., 2000). Ces protéines tirent leur nom du fait qu'elles ont été découvertes dans des graines de coton qui montrent une forte expression durant les étapes tardives de l'embryogenèse, moment où les graines acquièrent leur tolérance à la dessiccation (Galau and Dure, 1981). Cette capacité à éviter la précipitation et l'agrégation est une caractéristique qui pourrait être utile en cas de changements environnementaux brusques. Certaines LEA de plantes ont par exemple été isolées par des expériences de solubilité à haute température en analysant les fractions solubles à 80°C après 10 à 15 minutes de traitement (Russouw et al., 1995).

L'étude *in vitro* des LEA a montré que celles-ci empêchent les changements conformationnels des membranes lipidiques en agissant comme un « bouclier moléculaire » (Chakrabortee et al., 2007; Goyal et al., 2005). De plus, il a été suggéré qu'elles pourraient jouer le rôle de chélateur d'ions, séquestrant les ions métalliques, mais aussi le rôle de protéines antioxydantes (Liu et al., 2011).

Par ailleurs, l'expression hétérologue de LEA en cellules humaines ou cellules de *Drosophila melanogaster*, leur confère une plus forte tolérance à la déshydratation, au stress osmotique et à la congélation (Li et al., 2012; Marunde et al., 2013). Dans ces cellules, elles se localisent alors dans des compartiments spécifiques comme le cytosol, les mitochondries ou le réticulum endoplasmique, où elles jouent probablement un rôle protecteur sur les protéines environnantes (Li et al., 2012; Marunde et al., 2013).

Chez les rotifères bdelloïdes, les nématodes, certaines plantes et bactéries il a été montré une accumulation de LEA en réponse à la dessiccation (Bartels and Salamini, 2001; Hundertmark and Hinch, 2008; Liu et al., 2021; Solomon et al., 2000). Chez le nématode *C. elegans*, le rôle fonctionnel de LEA-1 dans la résistance à divers stress (thermique, hydrique, osmotique) a été démontrée à l'aide de mutants CRISPR/Cas9 et a permis l'identification d'un peptides fonctionnels minimal de 11 acides aminés capable de conférer une résistance à la dessiccation par expression dans *E. coli* (Hibshman and Goldstein, 2021). Toutefois, toutes

les protéines LEA ne sont pas impliquées dans la résistance à la dessiccation et sont aussi présentes chez une multitude d'espèces non tolérantes à la dessiccation (Battaglia et al., 2008).

Ces protéines qui manquent de conservation entre les différents groupes de LEA (Hunault and Jaspard, 2010), pourraient avoir évolué de manière convergente et être apparues indépendamment chez les tardigrades (Campos et al., 2013). Des séquences de LEA ont été retrouvées dans des bases de données de tardigrades à la fois chez les eutardigrades (*Milnesium inceptum*, *Hypsibius exemplaris*, *Richtersius coronifer*, *Tulinius stephaniae*) et hétérotardigrades (*Echiniscus testudo*), sans toutefois apporter la preuve que ces protéines soient impliquées dans leur résistance à la dessiccation (Förster et al., 2012, 2009).

Plus récemment, à la recherche de protéines similaires aux LEA dans des bases de données transcriptomiques de *R. varieornatus*, Tanaka et al. ont identifié une LEA mitochondriale putative sur la base d'homologies de séquence. Cette protéine baptisée RvLEAM présente des homologies de séquence avec des protéines LEA de nématodes. La prédiction informatique de sa localisation et l'expression d'une protéine de fusion RvLEAM-GFP en cellules de mammifères indiquent une localisation mitochondriale. Ces résultats ont été confirmés par des analyses immunohistochimiques sur des sections congelées d'embryons de *R. varieornatus*. Cette protéine maintient sa solubilité en réponse à un traitement thermique en lysat bactérien ou en protéine purifiée. Tandis que les protéines bactériennes précipitent, RvLEAM reste dans le surnageant, suggérant que cette protéine est bien thermosoluble et fonctionnelle sans partenaire extérieur. La diminution des quantités en eau pendant la dessiccation, fait varier les concentrations en ions des différents compartiments, ce qui cause probablement du stress osmotique (Vriezen et al., 2007). Et de manière intéressante, l'expression de RvLEAM en cellules humaines augmente significativement leur tolérance au stress osmotique (Tanaka et al. 2015). Ces résultats suggèrent que les LEA de tardigrades sont des agents importants dans leur tolérance au stress osmotique, mais probablement aussi la dessiccation en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Cela suggère une protection des protéines mitochondriales de ce tardigrade contre les stress osmotique ou de dessiccation, expliquant en partie sa grande tolérance.

Par ailleurs, l'analyse de séquences transcriptomiques a également révélé la présence de LEA (6-9 gènes putatifs) chez 3 eutardigrades de l'ordre Parachela (*R. coronifer*, *R. varieornatus*, *H. exemplaris*) et de 3 gènes putatifs chez l'hétérotardigrade *Echiniscoidea cf. sigismundi*, un hétérotardigrade (ordre Echiniscoidea) (Kamilari et al., 2019). Ainsi il serait intéressant d'étudier leurs propriétés thermosolubles, leur localisation et leur effet protecteur contre la dessiccation ou le stress osmotique afin de préciser leur fonction.

La synthèse de ces données permet de conclure que les LEA sont présentes dans les deux classes de tardigrades. Toutefois aucun arthrotardigrade (exclusivement marins) n'a été testé, donc il n'est possible de conclure sur la présence de LEA seulement chez les Echiniscoidea au sein de la classe des hétérotardigrades. A ce jour, néanmoins, il n'y a pas d'étude fonctionnelle chez les tardigrades démontrant leur rôle dans la dessiccation.

ii. Les protéines désordonnées uniques aux tardigrades : CAHS, SAHS et MAHS

- Des protéines solubles à haute température uniques aux tardigrades

La recherche de LEA chez les tardigrades a mené à la découverte de nombreuses familles de protéines intrinsèquement désordonnées, très hydrophiles, uniques aux tardigrades plus communément appelées protéines de tardigrade désordonnées ou TDP (Tardigrade Disordered Proteins) et partageant des similarités avec les LEA. En réalisant un protéome à 92°C pendant 15 minutes, afin de révéler les protéines stables en conditions de haute température chez l'eutardigrade *R. varieornatus*, très résistant à la dessiccation (Horikawa et al., 2008), deux familles de TDP appelées CAHS (Cytoplasmic-abundant heat soluble) et SAHS (Secretory-abundant heat soluble) ont été découvertes. Elles ont été nommées d'après la localisation observée quand elles ont été exprimées en lignées cellulaires humaines, les CAHS étant retrouvées au niveau cytosolique et les SAHS au niveau extracellulaire (Yamaguchi et al., 2012). Quelques années plus tard, en réalisant une expérience similaire sur les fractions mitochondriales, une nouvelle famille de TDP appelée MAHS (Mitochondrial-abundant heat soluble) a été découverte. Tandis que les gènes codant pour

les SAHS et CAHS sont présents en de nombreuses copies dans le génome, il n'y a qu'une seule copie de MAHS chez *R. varieornatus* (Tanaka et al., 2015).

R. varieornatus exprime de nombreuses TDP de manière constitutive comme évoqué dans le paragraphe mentionnant les voies de régulation de l'anhydrobiose (II.C.1) alors que *H. exemplaris* nécessite la synthèse de TDP *de novo* pour survivre à la dessiccation (Boothby et al., 2017). Tandis qu'aucun homologue de TDP n'a été retrouvé chez les hétérotardigrades, certains tardigrades comme *E. testudo* possèdent deux familles de protéines solubles à haute température qui ont été nommées EtAHS (pour « *Echiniscus Testudo* Abundant Heat Soluble »). Ces protéines présentes en plusieurs copies dans le génome sont constitutivement exprimées à haut niveau. Leur profil obtenu en RMN (Résonance magnétique nucléaire) montre qu'elles possèdent de longs domaines désordonnés et leur spectre de dichroïsme circulaire est comparable à celui obtenu pour les CAHS, avec des régions désordonnées qui se conforment en hélice α dans le trifluoroéthanol (TFE). Ces similarités suggèrent de manière intrigante une potentielle convergence évolutive de TDP chez les eutardigrades et les hétérotardigrades (Murai et al., 2021).

Il a été montré que des CAHS et SAHS augmentent significativement la résistance à la dessiccation après expression hétérologue dans des levures ou des bactéries (Boothby et al., 2017). Cet effet n'étant pas retrouvé via l'expression d'autres protéines intrinsèquement désordonnées, cela suggère que le désordre protéique n'est pas suffisant pour expliquer l'effet protecteur des TDP. Contrairement aux LEA, l'inhibition de CAHS et SAHS par ARN interférant a été menée chez le tardigrade *H. exemplaris* et a montré un rôle fonctionnel de ces protéines dans la survie à la dessiccation (Boothby et al. 2017).

- Structure et distribution cellulaires, mécanisme de protection par les TDP

Bien qu'elles soient différentes des LEA, les TDP possèdent des structures prédites communes avec ces dernières, comme leur haute propension à former des hélices α (Tanaka et al., 2015; Yagi-Utsumi et al., 2021b). Il a par exemple été montré *in vitro* que les protéines CAHS1 de *R. varieornatus* adoptent au niveau de la région C-terminale une structure en

hélice α amphiphile en condition de déshydratation et reprennent une structure en pelote aléatoire ou « random coil » après réhydratation. De plus, l'augmentation de la concentration en CAHS1 induit un effet similaire au niveau de la région C-terminale, ainsi que l'induction de l'homo-dimérisation de la protéine au niveau de cette région. Cet auto-assemblage de protéine forme des fibrilles détectables en microscopie à force atomique à haute vitesse (« HS-AFM ») quand la concentration augmente. Cette structure prend également la forme d'un hydrogel en solution aqueuse et ce de manière réversible. Ces données suggèrent que la déshydratation augmente la concentration de CAHS1 qui s'oligomérisent et entre réversiblement en transition sol-gel (Etat de solide à état de gel) au niveau cytosolique (Yagi-Utsumi et al., 2021b).

L'expression de CAHS1 chez *E. coli* entraîne la formation d'un réseau fibreux d'hélices α en condition de dessiccation. Le processus est alors réversible en changeant les conditions de pH, concentrations de sels et température. De plus, la surexpression en cellules HeLa de la protéine fusionnée à la mEGFP (CAHS1-mEGFP) montre une distribution homogène dans le cytoplasme en absence de stress osmotique qui change pour se réorganiser en petites particules au niveau nucléaire et cytosolique en réponse à un fort stress osmotique, encore une fois de manière réversible (Yagi-Utsumi et al., 2021b).

La formation de particules au niveau cytosolique ressemblant à des gouttelettes ne sont pas sans rappeler la forme des granules de stress qui protègent l'ARN pour répondre à des conditions de stress (Campos-Melo et al., 2021). Les auteurs de l'étude suggèrent que les séparations de phase liquide-liquide visibles *in vivo* favorisent la résistance à la dessiccation en formant des compartiments composés de CAHS1 qui forment de manière réversible un réseau fibreux capable de retenir l'eau et qui protègent les molécules sensibles à la dessiccation. De plus, ils font l'hypothèse que sous des conditions de dessiccation extrêmes, le réseau de CAHS1 pourrait agir en tant que chaperonne de dessiccation (« dry chaperone ») qui protégerait en plus des protéines, d'autres complexes moléculaires tels que l'ARN et les membranes (Yagi-Utsumi et al., 2021b).

Une étude de 2017 montre que les SAHS, un autre type de TDP, possèdent certaines structures similaires en diffraction aux rayons X à celles retrouvées dans la famille des protéines de liaisons aux acides gras (FABP: Fatty Acid Binding Protein) (Fukuda et al., 2017). En effet, comme les FABP, la diffraction aux rayons X de la protéine RvSAHS1 montre qu'elle possède des structures en tonneau β . Les tonneaux β des FABP étant connus pour séquestrer les hèmes et la bilirubine (Levi and Arias, 1969; Vincent and Muller-Eberhard, 1985), cela pourrait suggérer un rôle similaire pour les SAHS. La capture d'hèmes pourrait alors éventuellement empêcher la production d'ERO ou alors la relocalisation de la bilirubine, antioxydant puissant, pourrait aider à lutter contre le stress oxydatif de la dessiccation. L'analyse de la structure d'un paralogue de la protéine RvSAHS1, la protéine RvSAHS4 de *R. varieornatus* suggère qu'elle pourrait capturer, à la place, des ligands non chargés comme les alcools et les aldéhydes (Fukuda and Inoue, 2018).

L'étude générale de l'expression génique durant les phases de développement embryonnaire de *R. varieornatus* et *H. exemplaris* montre des variations significatives de l'expression de certaines CAHS et SAHS. Ces variations diffèrent entre les différents paralogues en fonction des stades jusqu'à 3 jours après la ponte. Elles ne sont pas similaires et ne surviennent pas aux mêmes stades de développement entre les deux espèces (Yoshida et al., 2019). Ces expériences suggèrent que les différents paralogues des CAHS et SAHS pourraient avoir des rôles particuliers et définis durant le développement embryonnaire de ces espèces, et il pourrait en être de même chez les tardigrades matures.

Enfin, les TDP mitochondriales que sont les MAHS améliorent la résistance au stress osmotique lorsqu'elles sont exprimées en cellules humaines mais le mécanisme sous-jacent reste inconnu (Tanaka et al., 2015). Ceci est renforcé par l'importance relative des mitochondries chez certains eutardigrades et la nécessité de les protéger des stress. Il a été montré par analyse ultrastructurale que les mitochondries changeaient de forme chez *H. exemplaris* durant l'anhydrobiose et que la chaîne respiratoire mitochondriale était importante dans la tolérance à la dessiccation de *M. inceptum*, probablement en jouant un rôle dans la lutte contre le stress oxydatif (Wojciechowska et al., 2021). Par ailleurs, le découplage de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale par le DNP (2,4-

dinitrophenol) diminue drastiquement la survie à la dessiccation de *R. coronifer* (Voir **tableau 2**) en empêchant l'entrée dans la forme anhydrobiotique (Halberg et al. 2013) .

III. Les tardigrades : des animaux résistants aux stress génotoxiques

Les tardigrades, en plus de présenter des tolérances extraordinaires aux stress abiotiques extrêmes tels que le sont la dessiccation, les fortes variations de concentrations salines et la congélation, sont également capables de résister à une variété de stress génotoxiques tant à l'état actif que cryptobiotique. Par ailleurs, dans le monde du vivant deux mécanismes généraux sont décrits pour pallier aux stress génotoxiques (1) la protection du protéome et de l'ADN contre les dommages induits par rayonnements ionisants (2) des systèmes de réparation de l'ADN permettant de reconstituer un génome fonctionnel. Les systèmes antioxydants peuvent aussi intervenir. Chez les organismes radiotolérants, comme les tardigrades, de nouveaux mécanismes originaux et/ou l'amélioration de mécanismes partagés avec le reste du vivant peuvent entrer en jeu.

Cette partie se divise en 3 sections, dans lesquelles j'exposerai les données sur la tolérance des tardigrades aux stress génotoxiques (rayonnements ionisants et ultraviolets). Dans un second temps, j'aborderai les mécanismes moléculaires connus et parfois originaux, que les tardigrades ont mis en place pour tolérer les stress génotoxiques. Puis enfin, à titre de comparaison, je donnerai quelques exemples d'autres espèces du règne du vivant qui ont développé des mécanismes originaux de résistance aux stress génotoxiques.

A. Données sur la tolérance des tardigrades aux rayonnements ionisants et aux ultraviolets

Depuis longtemps, de nombreuses études ont fait état de la tolérance des tardigrades à la dessiccation, il y a désormais un intérêt croissant pour leur tolérance aux stress génotoxiques

et notamment les rayonnements ionisants et ultraviolets. Dans cette section, je présenterai les stress génotoxiques les plus usuels, notamment ceux utilisés durant mon travail de recherche pour étudier la tolérance des tardigrades, ensuite je présenterai l'état de l'art concernant les expériences de survie et de tolérance aux rayonnements ionisants et ultraviolets chez les tardigrades.

1. Types de stress génotoxiques

Le stress génotoxique désigne les dommages ou les altérations du matériel génétique, tel que l'ADN ou l'ARN, qui surviennent à la suite d'une exposition à des substances ou à des agents génotoxiques. Ces substances ou agents peuvent perturber la structure, générer des cassures et des mutations de l'ADN et interférer avec les processus de réplication ou de transcription. L'ampleur des stress génotoxiques et la capacité des cellules à réparer les dommages peuvent avoir des répercussions importantes sur la santé et la survie de l'organisme.

a. Le stress oxydatif, source majeure de dommages à l'ADN

L'une des causes majeures de dommages à l'ADN est le stress oxydatif, qui se définit comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires à les détoxifier via des processus antioxydants (Sies, 1997). Les ERO peuvent être produits par des agents exogènes tels que les rayonnements ionisants, les ultraviolets, certains agents chimiques mais aussi la dessiccation (Azzam et al., 2012; de Jager et al., 2017; Giovannini et al., 2022a). Ils peuvent également être d'origine endogène, produits par le catabolisme oxydatif de certains métabolites (Fraga et al., 1990). L'interaction directe des ERO avec l'ADN peut causer des dommages. Toutes les ERO n'affectent pas la molécule d'ADN de manière similaire, les ions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène quand ils sont à des niveaux physiologiques, n'attaquent pas forcément l'ADN, mais en excès, leur réaction avec d'autres molécules peuvent produire d'autres types d'ERO tels que les radicaux hydroxyles, beaucoup plus réactifs. Cela peut conduire à des altérations ou la cyclisation de sucres et des bases, des cross-links entre ADN et protéines et la formation de liaisons intra-

et inter-brins qui peuvent mener à la génération de cassures simples et double brin (CSB et CDB) (Gonzalez-Hunt et al., 2018).

b. Stress génotoxiques liés à la dessiccation

Les changements dus à la perte d'eau peuvent générer des altérations de l'organisation moléculaire, y compris des acides nucléiques et générer des dommages à l'ADN.

Par exemple, chez la plante *Acer pseudoplatanus*, la formation de cassures double-brin d'ADN et de lésions 8-oxoG est imposée par un stress de dessiccation graduel (Plitta-Michalak et al., 2022). La dessiccation chez la bactérie *Deinococcus radiodurans* induit des CDB et ceux-ci s'accumulent avec le temps passé en état desséché. En effet, 6 semaines de dessiccation induisent un minimum de 60 CDB. (Mattimore and Battista, 1996). Chez la larve du chironomide *Polypedilum vanderplanki* résistant à la dessiccation et aux rayonnements ionisants, on observe une fragmentation de l'ADN nucléaire similaire après l'anhydrobiose ou après une irradiation à 70Gy aux rayonnements ionisants aux ions He (Rayonnements ionisants à Haut transfert d'énergie linéique, développé dans la partie III.A.1.c: rayonnements ionisants) (Gusev et al., 2010). Chez les rotifères bdelloïdes également capables d'anhydrobiose, la dessiccation et notamment le fait de rester en anhydrobiose de manière prolongée entraînent une diminution de l'intégrité du génome, et l'accumulation de dommages à l'ADN, notamment des CDB (Hespeels et al., 2014). Enfin, chez le tardigrade *Milnesium inceperum*, il a été aussi montré que les cassures de l'ADN sont minoritaires au moment de la dessiccation, mais qu'elles s'accumulent proportionnellement au temps passé en anhydrobiose (Neumann et al., 2009).

L'explication pourrait provenir du fait que les périodes de dessiccation s'accompagnent d'une augmentation du taux d'ERO intracellulaires (Kranner and Birtić, 2005; França et al., 2007). En temps normal, la quantité d'ERO est contrôlée par différents processus pro- et antioxydants permettant de maintenir un équilibre (Favier, 2003). Or, pendant la dessiccation, l'organisme diminue peu à peu son contrôle sur son activité métabolique, il a donc été supposé que le taux de ROS n'est alors plus contrôlé et augmente, provoquant

alors un stress oxydatif au sein de la cellule (Kranner and Birtić, 2005). L'origine exacte des ERO induits par la dessiccation n'est pas encore connue mais il est supposé que des dysfonctionnements transitoires des enzymes ou des chaînes de transport d'électrons peuvent conduire à la production d'ERO ou favoriser des réactions chimiques qui ne se produisent normalement pas à l'état hydraté. Ces conditions induisent aussi des dommages dus à l'oxydation des composants cellulaires, avec l'apparition d'éléments toxiques pour l'organisme au niveau membranaire, protéique et au niveau de l'ADN (Anchordoguy et al., 1990; Prestrelski et al., 1993; Faria et al., 2005; França et al., 2007).

En résumé, la dessiccation entraîne des dommages de l'ADN chez de nombreux animaux pourtant résistants à celle-ci et leur nombre augmente avec le temps passé en anhydrobiose.

c. Rayonnements ionisants

La cascade de processus physiques, chimiques et biologiques générés par les radiations ionisantes sont difficiles à prédire étant donné que les effets s'étalent dans le temps et l'espace. Les risques d'ionisation sont dépendants du type de rayonnement et chaque type de rayonnement ionisant est caractérisé par un paramètre physique appelé Transfert d'Energie Linéique (TEL) qui décrit l'énergie moyenne (en KeV) cédée par une particule en fonction de la distance parcourue par celle-ci. Les particules très chargées (Z élevé) comme les particules α , β^- ou β^+ ou les ions Fer (Fe, He...) ont un haut TEL et produisent de nombreuses ionisations sur leur passage. A l'inverse, les rayonnements γ ou X, qui sont électromagnétiques, produisent moins d'ionisations et sont considérées comme des radiations ionisantes à faible TEL. Ces derniers vont principalement générer des ERO qui vont ioniser la matière et générer en majorité des cassures simple brin et une part de cassures double brin (~20%). La complexité des dommages générés augmente avec TEL. Plus les cassures sont complexes et plus le temps nécessaire pour les réparer augmente. Ainsi les rayonnements à haut TEL génèrent surtout des dommages directs et complexes, comme des CDB (~90% des dommages générés) (Hagiwara et al., 2019; Mavragani et al., 2019).

d. Rayonnements ultraviolets

Les ultraviolets (UV) sont la source principale de rayonnements non-ionisants qui génèrent des dommages dans l'ADN. En effet, ils peuvent réagir avec les molécules d'ADN et causer des dommages, mais leur mode d'action dépend grandement de leur longueur d'onde. Ces rayonnements atteignent les cellules superficielles des organismes irradiés.

Les UVC et les rayonnements de courtes longueurs d'ondes des UVB sont absorbés par la molécule d'ADN conduisant à son excitation. Cela entraîne la formation de dimères de pyrimidines ou de photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone formant des ponts qui modifient localement la structure de l'ADN qui peuvent mener à la génération de cassures au moment de la réplication ou la transcription si elles ne sont pas réparées à temps (Rastogi et al., 2010). Les UVA et une part des UVB (longueur d'onde longue) induisent indirectement des dommages à l'ADN et au niveau protéique en excitant des composants cellulaires qui pour se désexciter réagissent en produisant à leur tour des ERO. Les rayonnements UV peuvent aussi photosensibiliser les cellules. Bien que ces rayonnements ne soient pas directement ionisants, les ERO générés peuvent par contre ioniser la matière et mener à l'oxydation de guanines en 7,8-dihydroguanine (8-oxoG) qui induisent des transversions du type G-T dans l'ADN (Douki et al., 2000; Rastogi et al., 2010; de Jager et al., 2017).

e. Agents chimiques génotoxiques : la bléomycine

Certaines molécules toxiques présentes dans l'environnement ou dans l'alimentation peuvent pénétrer dans les cellules et y libérer des ERO. D'autres molécules possèdent une affinité particulière pour l'ADN ou pour certaines enzymes interagissant avec l'ADN. Leur interaction avec le double-brin peut alors déboucher sur des erreurs lors de la réplication ou sur des cassures par blocage de la fourche de réplication. Enfin d'autres peuvent couper directement l'ADN.

C'est typiquement le cas de la bléomycine, molécule utilisée durant mon travail de recherche. C'est un glycopeptide produit par *Streptomyces verticillus* qui peut générer des CSB et des

CDB en présence de certains co-facteurs. C'est une protéine à fer non héminique qui s'intercale avec l'ADN, mais dont le mécanisme exact de génération de cassures n'est pas totalement élucidé (Chen et al., 2008). Il a toutefois été hypothétisé que la bléomycine chélatait des ions métalliques, menant ainsi à la production de pseudoenzymes sans co-facteur qui réagissent avec l'oxygène (Sausville et al., 1978), produisant ainsi des ions superoxydes et des radicaux hydroxyle. Une autre hypothèse soutient que la bléomycine interagit directement avec l'ADN menant à son ionisation et la formation de cassures (Murray et al., 2018).

2. Survie des tardigrades aux rayonnements ionisants et ultraviolets

Dans cette partie, je résume l'ensemble de la littérature réalisée sur la tolérance des tardigrades aux rayonnements ionisants (**Tableau 3.1**) et ultraviolets (**Tableau 3.2**) puis je discute de l'origine possible de cette tolérance.

a. Tolérance aux rayonnements ionisants

i. Limites de la comparaison entre les différentes études sur la radiotolérance

Il est à noter qu'une majorité des études sur les effets des rayonnements sur les tardigrades basent la mesure de la tolérance sur la viabilité apparente de l'animal (elle-même souvent basée sur la présence ou absence de mouvement par exemple) plutôt que sur les effets au niveau cellulaire ou moléculaire. Par conséquent, la tolérance apparente présentée ici ne signifie pas objectivement que les animaux ne sont pas affectés par l'exposition aux rayonnements ou par les dommages causés et il serait pertinent de réaliser des études comparant les performances phénotypiques générales aux effets aux niveaux cellulaire et moléculaire. Je tiens à préciser également que ce tableau ne présente que les expériences réalisées sur des tardigrades matures, ainsi n'est pas rapportée la tolérance aux

rayonnements des embryons ou de tardigrades juvéniles qui y sont généralement plus sensibles. De plus, bien que certaines études s'intéressent aux mêmes types de rayonnements, il n'est pas assuré que celles-ci soient strictement comparables. En effet, le matériel d'irradiation utilisé, la calibration de la source d'émission, l'état des tardigrades au moment de l'irradiation (nourris, à jeun, régime alimentaire, âge moyen de la population étudiée), la méthode de mesure de la survie, ou les habitudes de l'expérimentateur sont tout autant de raisons d'observer des variabilités entre les différentes études, à doses comparables pour un organisme donné. Bien que conscient de ces biais potentiels, je m'en affranchis lors de la discussion qui suit.

ii. Description générale de la radiotolérance aux rayonnements ionisants

Les études qui ont été réalisées sur la tolérance aux rayonnements ionisants à faible TEL (**tableau 3.1**) font état chez la plupart des eutardigrades testés à l'état hydraté ou anhydrobiotique de LD50 allant de 3kGy à 5,7kGy. Concernant les hétérotardigrades, aucune expérience de tolérance n'a été réalisée sauf pour *E. sigismundi* après exposition à des rayonnements γ . Sa LD50 de 1,59kGy, bien qu'élevée par rapport à d'autres organismes non radiotolérants, est très en deçà de celles des eutardigrades testés. Cela suggère que les hétérotardigrades peuvent montrer une certaine radiotolérance, bien que moindre comparée aux eutardigrades.

Le peu d'études qui ont été réalisées sur la radiotolérance des tardigrades aux rayonnements à haut TEL fait état de LD50 s'étendant de 5,4kGy à 10,24kGy. Ces études n'ont été réalisées que sur des tardigrades de l'ordre Apochela, *R. coronifer* et *M. inceptum*.

iii. Une radiotolérance à l'état actif plus importante qu'à l'état anhydrobiotique

L'observation des données de survie en réponse aux rayonnements ionisants semble montrer que les tardigrades sous forme anhydrobiotique, leur forme la plus résistante aux

conditions extrêmes, n'ont pas une survie plus élevée que la forme active. C'est d'ailleurs l'inverse qui est observé dans toutes les publications où la comparaison de la tolérance entre les deux états est réalisée, à l'exception de l'exposition aux rayonnements α réalisée par May et al., 1964. Cela suggère que les tardigrades testés possèdent bien des mécanismes actifs de protection et réparation des composants cellulaires et moléculaires endommagés qui peuvent s'activer indépendamment de la réponse à la dessiccation. Il est possible qu'il y ait un effet additif entre les dommages liés à l'irradiation et les dommages ou les ERO accumulés durant la forme anhydrobiotique (Neumann et al., 2009) qui pourrait expliquer une vulnérabilité supérieure à l'état anhydrobiotique.

iv. Une radiotolérance plus élevée aux rayonnements à haut TEL ?

A doses égales, les rayonnements particuliers à haut TEL sont beaucoup plus nocifs pour les tissus et l'ADN que les rayonnements à faible TEL (M. Anderson, 2000). Comme exposé précédemment, les rayonnements à haut TEL génèrent des dommages complexes sur l'ADN et notamment des CDB quand les rayonnements à faible TEL génèrent en majorité du stress oxydant, mais aussi, en moindre proportion des CSB et des CDB. Pourtant les quelques études qui se sont intéressées aux rayonnements haut TEL sur les tardigrades, semblent montrer qu'ils y sont plus résistants qu'aux rayonnements ionisants à faible TEL comme *R. coronifer* (Nilsson et al. (2010 ; Jönsson et al. 2005). Cela pourrait éventuellement suggérer que les tardigrades sont mieux équipés pour tolérer les dommages à l'ADN que les dommages non génotoxiques induits par le stress oxydant, comme les dommages protéotoxiques ou sur les lipides. Toutefois, trop peu d'études ont été réalisées sur les radiotolérances aux rayonnements à haut TEL pour pouvoir conclure.

b. Tolérance aux rayonnements ultraviolets

Il est difficile de comparer les tolérances aux rayonnements UV entre différentes études étant donné la différence entre les nombreuses variations expérimentales, à commencer par les doses et les longueurs d'ondes utilisées. Je ne compare donc ici que les résultats au sein d'une même étude.

De manière générale, on observe que les tardigrades irradiés aux UV sous leur forme anhydrobiotique sont plus résistants que sous leur forme active (cas de *R. varieornatus*: Horikawa et al. 2013), et plus le pourcentage d'humidité relative est faible, plus la tolérance semble augmenter (Cas de *P. richtersi*: Altiero et al. 2011) . Il est possible que les rayonnements UV soient moins délétères sous la forme anhydrobiotique qui limite les réactions chimiques en raison de l'absence ou la diminution d'eau. Enfin, le tardigrade *H. exemplaris*, moins tolérant à la dessiccation rapide est extrêmement sensible aux UVC en comparaison de *R. varieornatus*, ce qui rentre en contradiction avec les résultats observés en réponse aux rayonnements ionisants à faible TEL. Dans le cas des UV, la tolérance semble corrélée avec la capacité à tolérer la dessiccation.

Tableau 3.1 : Études en lien avec la tolérance aux rayonnements ionisants chez les tardigrades. Les espèces sur fond gris sont des tardigrades semi-terrestres et sur fond bleu des tardigrades marins

	Type de rayonnement et doses testées	Etat	LD50 ou % de survie	Effets sur la reproduction	Remarques	Auteur
Irradiations à faible TEL: rayonnement X ou γ						
<i>Hypsibius exemplaris</i>	γ : 0,1 - 5kGy	Hydraté	- LD _{50/24h} =4,2 kGy	Pas de différence de fertilité avec le contrôle jusqu'à 100Gy. Infertilité totale à partir de 500Gy.		Beltrán-Pardo et al. (2015)
	γ : 3kGy et 5kGy	Hydraté	Survie à J10: - Contrôle: 35% - 3kGy: 12% - 5kGy: 5% - Bystander 3kGy: 22% - Bystander 5kGy: 22%	Pas d'information	(1)	Fernandez et al. (2016)
<i>Richtersius cf. coronifer</i>	γ : 1 - 9kGy	Anhydrobiotique	- LD _{50/22h} =3kGy	Pas d'effet sur la fécondité jusqu'à 2kGy - les œufs n'éclosent pas même dans le contrôle		Jönsson et al. (2005)
	γ : 0,5 - 5kGy	Hydraté	- LD _{50/18h} =4,7kGy	Pas d'effet sur la fécondité jusqu'à 2kGy - les œufs n'éclosent pas sauf dans le contrôle		Jönsson et al. (2005)
	X: 50 - 2000Gy	Anhydrobiotique	- 40% de survie 24h post-irradiation à 1000Gy - 0% de survie 24h post-irradiation à 2000Gy	Diminution du taux de production d'œufs en fonction de la dose, mais statistiquement non significative. Possiblement en raison de la taille limitée de l'échantillon étudié.	(2)	Jönsson and Wojcik (2017)
	γ : 500Gy	Anhydrobiotique	Non atteinte	Pas d'information	(3)	Jönsson et Schill (2007)
	γ : 500Gy	Hydraté	Non atteinte	Pas d'information		Jönsson et Schill (2007)
<i>Paramacrobrotus areolatus</i>	X: 1 - 12kGy	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} =5,4kGy	Pas d'information		May et al. (1964)
	X: 1 - 12kGy	Hydraté	- LD _{50/24h} =5,7kGy	Pas d'information		May et al. (1964)
<i>Milnesium inceptum</i> (anciennement <i>Milnesium tardigradum</i>)	γ : 0,5 - 7kGy	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} =5,2kGy	Pas de ponte pour les irradiations > 2kGy - Aucune éclosion sauf dans le contrôle		Horikawa et al. (2006)
	γ : 0,5 - 7kGy	Hydraté	- LD _{50/24h} =5,4kGy	Pas d'information		Horikawa et al. (2006)
	γ : 70Gy	Hydraté	Non atteinte	Pas d'information	(4)	Beltrán-Pardo et al. (2013)
<i>Echiniscoides sigismundi</i>	γ : 0,1 - 5kGy	Hydraté	- LD _{50/24h} =1,59kGy	Pas d'information	(5)	Jönsson et al. (2016a)
Irradiations à haut TEL: rayonnement α, β- ou β+ ou ions						
<i>Ramazottius varieornatus</i>	Ions Helium (He): 4000Gy	Anhydrobiotique	100% de survie	Pas d'information	(6)	Horikawa et al. (2008)
	Ions Helium (He): 4000Gy	Hydraté	100% de survie	Pas d'information		Horikawa et al. (2008)
<i>Milnesium inceptum</i> (anciennement <i>Milnesium tardigradum</i>)	Rayonnement α : 5 - 8kGy	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} =5,4kGy	Pas d'information		Horikawa et al. (2006)
	Rayonnement α : 5 - 8kGy	Hydraté	- LD _{50/24h} =6,3kGy	Pas d'information		Horikawa et al. (2006)
<i>Richtersius cf. coronifer</i>	Protons: 0,5 - 15kGy	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} =10,24kGy	Pas d'information	(7)	Nilsson et al. (2010)
	Ions Helium (He): 50 - 1000Gy	Anhydrobiotique	Non atteinte	Diminution du taux de production d'œufs en fonction de la dose, mais statistiquement non significative. Possiblement en raison de la taille limitée de l'échantillon étudié.	(8)	Jönsson and Wojcik (2017)
	Ions Fer (Fe): 50 - 2000Gy	Anhydrobiotique	Non atteinte		(9)	Jönsson and Wojcik (2017)

- (1) Mesure de la survie sur 30 jours avec ou sans effet Bystander: mise en contact de tardigrades irradiés avec des tardigrades non irradiés (exposition indirecte). Diminution de la survie dose dépendante Les tardigrades non exposés mais ayant subi l'effet bystander ont une survie diminuée par rapport aux contrôles mais supérieure aux irradiés.
- (2) Survie bien moindre par rapport l'étude de Jönsson et al. (2005) après irradiation γ
- (3) Induction de Hsp70 en réponse à l'irradiation en comparaison du contrôle Induction similaire aux conditions de deshydratation ou de choc thermique
- (4) Forte induction de la protéine Rad51, recombinaise impliquée dans la réparation de l'ADN
- (5) Tardigrade marin (Classe heterotardigrada, ordre Echiniscoidea)
- (6) Une seule dose testée
- (7) Très peu affecté jusqu'à 10kGy. Au-dessus la survie chute brutalement et est quasiment nulle à 15kGy
- (8) Aucune mortalité au 7ème jour à la dose maximale (1000Gy)
- (9) Aucune mortalité au 7ème jour à la dose maximale (2000Gy)

Tableau 3.2 : Études en lien avec la tolérance aux rayonnements ultraviolets chez les tardigrades.

	Type de rayonnement et doses testées	Etat	LD50 ou % de survie	Effets sur la reproduction	Remarques	Auteur
Rayonnement ultraviolets						
<i>Hypsibius exemplaris</i>	UVC : 254 nm : 2,5kJm ⁻² - 20kJ.m ⁻²	Hydraté	- 0% de survie dès 2,5kJm ⁻²	Aucune information car tous les individus meurent dès la première dose		Horikawa et al. (2013)
	UVC : 254 nm : 60kJm ⁻² - 180kJ.m ⁻²	Anhydrobiotique	- Irradiés: 18% - 27% de survie à 60kJm ⁻² - Contrôles: 40 -45% de survie à 60kJm ⁻²	Pas de différence de fertilité avec les contrôles: ~1,5 - 2 œufs / adulte Taux d'éclosion des œufs de 11%	(1)	Kuzmic et al. 2018
	UVC : 254 nm : 60kJm ⁻² - 180kJ.m ⁻²	Hydraté	- 0% de survie dès 60kJm ⁻²	Aucune information car tous les individus meurent dès la première dose		Kuzmic et al. 2019
<i>Ramazzottius varieornatus</i>	UVC : 254 nm : 2500kJm ⁻² - 20kJ.m ⁻²	Anhydrobiotique	- 98% de survie à 10kJm ⁻² à J5 post irradiation - 80% de survie à 20kJm ⁻² à J5 post irradiation - 20% de survie à 10kJm ⁻² et 20kJm ⁻² à J30 post irradiation	Production d'œufs jusqu'à la dose maximale de 20kJm ⁻² Diminution rapide de la production en fonction de la dose Aucun impact de l'irradiation sur l'éclosion des œufs		Horikawa et al. (2013)
	UVC : 254 nm : 2500kJm ⁻² - 20kJ.m ⁻²	Hydraté	- 81,1% de survie à 2,5kJm ⁻² à J5 post irradiation - 45% de survie à 2,5kJm ⁻² à J30 post irradiation - 20% de survie à 10kJm ⁻² à J5 post irradiation - 0% de survie à 10kJm ⁻² dès J15 post irradiation	Production diminuée de 70% par rapport au contrôle à 2,5kJm ⁻² . Aucune ponte au dessus de cette dose. Taux d'éclosion des œufs à 80%	(2)	Horikawa et al. (2013)
<i>Ramazzottius oberhaeuseri</i>	UVB : 312 nm : 10.32 à 87.72 kJm ⁻²	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} =49,67kJm ⁻² à 35% d'humidité relative	Pas d'information	(3)	Altiero et al. (2011)
	UVB : 312 nm : 10.32 à 87.72 kJm ⁻²	Hydraté	- LD _{50/24h} =35,83kJm ⁻²	Pas d'information		Altiero et al. (2011)
<i>Paramacrobiotus areolatus</i>	non fournie UVC : 254 nm	Anhydrobiotique	Aucun effet sur la survie au bout de 6h d'exposition	Pas d'information		May et al. (1964)
	non fournie UVC : 254 nm	Hydraté	- Survie de 59% au bout d'1h d'exposition	Pas d'information		May et al. (1964)
<i>Paramacrobiotus richtersi</i>	UVB : 312 nm : 10.32 à 87.72 kJm ⁻²	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} =62,42kJm ⁻² à 35% d'humidité relative - LD _{50/24h} =40,64kJm ⁻² à 50% d'humidité relative	Pas d'information	(3)	Altiero et al. (2011)
	UVB : 312 nm : 10.32 à 87.72 kJm ⁻²	Hydraté	- LD _{50/24h} =44.57kJm ⁻²	Pas d'information		Altiero et al. (2011)
<i>Macrobiotus kyoukenus</i>	UVB : 312 nm : 2.58 kJ m ⁻² à 178.02 kJ m ⁻² UVC: 254 nm : 2.5 kJ m ⁻² à 40.00 kJ m ⁻²	Anhydrobiotique	- LD _{50/24h} (UV _B) =97,57kJm ⁻² - LD _{50/24h} (UV _C) =14,42kJm ⁻²	Pas d'information		Cesari et al. (2022)
	UVB : 312 nm : 2.58 kJ m ⁻² à 178.02 kJ m ⁻² UVC: 254 nm : 2.5 kJ m ⁻² à 40.00 kJ m ⁻²	Hydraté	- LD _{50/24h} (UV _B) =80,11kJm ⁻² - LD _{50/24h} (UV _C) =8,44kJm ⁻²	Pas d'information		Cesari et al. (2022)
<i>Richtersius coronifer</i>	UVALL: 280–400 nm : 7095 kJm ⁻² UVA + B: 116.5–400 nm : 7577 kJm ⁻²	Anhydrobiotique	- Survie aux UV _{ALL} : 0% - Survie aux UV _{A,B} : ~2% (Cf. remarques)	Diminution de la production d'œufs. Les œufs pondus après irradiation UV _{A,B} n'éclosent pas. Pas de pontes après irradiation aux UV _{ALL} car survie des adultes nulle.	(4)	Jönsson et al. (2008)
<i>Milnesium inceptum</i> (anciennement <i>Milnesium tardigradum</i>)	UVALL: 280–400 nm : 7095 kJm ⁻² UVA + B: 116.5–400 nm : 7577 kJm ⁻²	Anhydrobiotique	- Survie aux UV _{ALL} : ~3% - Survie aux UV _{A,B} : ~35% (Cf. remarques)	Diminution de la production d'œufs Les œufs pondus après irradiation UVA,B éclosent		Jönsson et al. (2008)

- (1) Forte mortalité après réhydratation dans les contrôles
- (2) Accumulation de dimères de thymine et surexpression de la photolyase A (PhrA) à 18h post irradiation.
- (3) Evaluation de l'impact de l'humidité relative et de la température face aux UV:
 - meilleure survie à 35% d'humidité relative qu'à 50% d'humidité relative
 - Les températures élevées (35°C) impactent négativement la survie
- (4) Expérience réalisée en condition de vide spatial. Exposition aux rayonnements solaires pendant 10 jours. Et survie mesurée après réhydratation (16-22 jours après la fin de l'exposition).
Pourcentages de survie après réhydratation donnés pour 4 réplicats, 30 individus par réplicat

c. Origine de la résistance aux rayonnements ionisants et UV

L'hypothèse d'une tolérance croisée entre résistance à la dessiccation et résistance aux rayonnements ionisants / UV est souvent avancée. La tolérance croisée peut se produire lorsqu'un organisme a développé des mécanismes pour se protéger d'un type de facteur de stress, qui assurent également une protection contre l'autre type de facteur de stress. Dans le cadre de cette hypothèse, un organisme qui est tolérant à la dessiccation pourrait également être tolérant aux radiations, car les mécanismes qui protègent contre la dessiccation pourraient également protéger contre les dommages induits par les radiations. Bien que cette hypothèse ne soit pas formellement prouvée, la corrélation entre les deux types de tolérance interpelle. Cette hypothèse n'est pas nouvelle dans la recherche sur les anhydrobiontes, comme les rotifères bdelloïdes (Hespeels et al., 2020) pour expliquer la tolérance aux stress génotoxiques. En se plaçant avec cet angle de réflexion sur la problématique de l'anhydrobiose chez le tardigrade, il est alors possible de décomposer les mécanismes de la machinerie anhydrobiotique en différents aspects, comprenant notamment la résistance aux dommages à l'ADN, au stress oxydatif, au manque d'eau, à l'agrégation protéique ou aux changements de concentration en sels. Ainsi, en étudiant de manière croisée, d'une part la réponse transcriptomique ou protéomique des tardigrades à la dessiccation et d'autre part leur réponse aux stress génotoxiques, on pourrait mettre en évidence les mécanismes que les tardigrades ont spécifiquement acquis pour répondre aux stress génotoxiques (Arakawa, 2022).

B. Mécanismes mis en jeu pour résister aux stress génotoxiques

A la lumière des données résumées obtenues à partir des différentes études sur la tolérance des tardigrades à la dessiccation et à certains stress génotoxiques, j'ai tenté d'exposer que ces derniers montraient effectivement des tolérances impressionnantes et en faisaient des modèles d'intérêt pour étudier la résistance aux stress génotoxiques et plus particulièrement aux rayonnements ionisants. Par conséquent, l'étape suivante est de discuter des données qui relatent les mécanismes sous-jacents à leur tolérance.

Afin de détailler ces points, je ferai au préalable une présentation succincte des voies de réparation des dommages décrites chez la plupart des eucaryotes, pour ensuite décrire les mécanismes de réparation de l'ADN chez les tardigrades, ainsi que leurs réponses aux stress génotoxiques. Pour finir, je développerai le cas particulier de la protéine Dsup, protéine unique aux tardigrades qui pourrait avoir un rôle dans la résistance aux dommages.

1. Les dommages à l'ADN et leur réparation

a. De nombreux types de dommages à l'ADN et des voies de réparation spécifiques

i. Réparation des bases modifiées par Excision de Base (BER)

Certaines bases azotées de l'ADN sont modifiées par alkylation, oxydation ou déamination. Ces bases sont alors reconnues par des ADN glycosylases qui peuvent retirer la base modifiée (par ex. ADN glycosylase UNG1), créant un site apurique ou apyrimidique suivi d'un clivage de l'ADN en 5' du site abasique par une AP endonucléase, ou aussi elles peuvent retirer un nucléotide (ADN glycosylases NEIL1-3). Puis une DNA polymérase (polymérase β ou ϵ) ajoute la base manquante par complémentarité avec le brin intact. Enfin une ligase (DNA Ligase 3 ou 1), permet la ligation du brin réparé ((Robertson et al., 2009)). D'autres

protéines participent à ces différentes étapes comme, XRCC1, PARP1-4 ou la polynucléotide kinase, PNPK.

ii. Réparation des mésappariements de bases par la Réparation des Mésappariements (MMR)

La voie MMR prend en charge les mésappariements lors de la réplication. MutS reconnaît le mésappariement. Puis MutS recrute MutL qui à son tour, recrute différentes protéines sur le site, permettant l'excision de la région mésappariée sur le brin fille, notamment l'exonucléase EXO1 et une zone d'ADNsb recouverte de RPA est ainsi générée. Finalement la réparation se conclut par la néopolymérisation et la ligation du brin réparé (Li, 2008).

iii. Réparation des pontages par Excision de Nucléotides (NER)

Le NER implique plus de 30 protéines et permet la réparation des dimères de thymine formés après exposition aux UV ou des pontages intrabrans générés par le cisplatine, un agent chimique génotoxique. Très schématiquement, la reconnaissance des dommages fait intervenir la protéine XPC pour la voie GG-NER (global genome NER) et CSB et CSA pour la voie TC-NER (transcription coupled NER). Puis TFIIH va permettre l'ouverture de l'ADN. L'action successive de ERCC1/XPF puis de XPG permet l'excision d'une zone de 20-30 nucléotides autour de la zone lésée. La séquence est reconstituée par les DNA polymérases (δ ou ϵ) selon la complémentarité avec le brin intact, puis une DNA Ligase (LIG3 ou LIG1) (Marteijn et al., 2014)

iv. Les cassures double brin sont réparées par différentes voies

Les cassures double brin (CDB) se produisent lorsque les deux brins de l'ADN sont rompus. Il existe plusieurs voies de réparation de ces dommages, principalement la recombinaison homologue (RH) et la jonction d'extrémités non-homologues (c-NHEJ). Mais il existe aussi des voies alternatives appelées Alt-EJ (ou MMEJ) et Single Strand Annealing (SSA). Les CDB sont considérés comme particulièrement dangereuses pour la cellule car elles menacent

l'intégrité des chromosomes et leur réparation doit absolument aboutir, sinon elle mène à la mort cellulaire (Grabarz et al, 2012). Les mécanismes de réparation des cassures double-brin sont plus complexes que ceux des cassures simple-brin. Les réparations mal effectuées peuvent aussi avoir des conséquences graves sur le fonctionnement de la cellule. Dans la section suivante, je vais décrire les différentes voies de réparation des cassures double-brin.

b. Fonctionnement des principales voies de réparation des cassures double-brin d'ADN

Les CDB sont des lésions hautement toxiques. Les cellules ont développé des mécanismes spécifiques de détection et de réparation de ces cassures.

i. Détection des CDB

Chez l'Homme, la réponse aux CDB débute par l'activation d'ATM, une kinase de la famille PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui est recrutée au niveau de la chromatine par le complexe MRN, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, en réponse à l'apparition de CDB. Ce recrutement déclenche une cascade de phosphorylations qui mène à l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire et le recrutement de protéines de réparation au niveau des sites de cassure. Cela débute notamment par la phosphorylation du variant d'histone H2AX par ATM qui devient alors γ H2AX. Cette phosphorylation déclenche un phénomène de rétrocontrôle positif. En effet le variant γ H2AX en association avec MDC1 permet le recrutement de protéines ATM supplémentaires qui vont-elles même recruter encore plus de protéines de réparation et phosphoryler davantage d'histones H2AX.

Les protéines de réparation recrutées par ATM mènent vers les deux voies prédominantes de réparation des CDB, la RH et le c-NHEJ. Toutefois l'existence d'un mécanisme alternatif de ligation d'extrémités non-homologues d'ADN a été découvert, appelé Jonction d'extrémités alternatif (ou Alt-EJ pour « Alternative end-joining »). Enfin il existe un mécanisme appelé hybridation simple brin (ou SSA : Single Strand Annealing). La coexistence de ces quatre voies de réparation des CDB nécessite la mise en place de système

de régulation afin de choisir la voie plus adéquate en fonction de l'étape du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve (**Figure 8 A**) (Ceccaldi et al., 2016).

ii. Choix de la voie de réparation

Je présente ici des données obtenues chez des mammifères. La première phase de signalisation fait intervenir l'activation de kinases, et la phosphorylation de cibles spécifiques va permettre le recrutement de protéines au site de cassure. Les premières protéines phosphorylées qui sont recrutées au niveau du site de cassure sont 53BP1 et CtIP et vont déterminer par quelle voie la réparation se fera. L'équilibre entre 53BP1 et BRCA1 module le choix de la voie soit en bloquant, soit en permettant la résection (**Figure 8 B**).

53BP1 recrute RIF1 qui permet à son tour le recrutement du complexe Shieldin (Chapman et al. 2013 ; Gupta et al., 2018) et protège ainsi les extrémités de la cassure de la résection, et dans le même temps inhibe le recrutement de BRCA1 et bloquant l'accès à CtIP, dirigeant ainsi la réparation vers le c-NHEJ (Bunting et al., 2010; Escribano-Díaz et al., 2013).

Une première phase de résection des extrémités de la cassure par CtIP et la nucléase MRE11 d'un petit nombre de paires de bases (20pb chez les mammifères) débute et libère des extrémités d'ADNsb qui peuvent être réparées par Alt-EJ (Truong et al., 2013). Une seconde phase de résection des extrémités par des hélicases et exonucléases (CtIP, DNA2, BLM, WNR et EXO1) génère un long ADNsb qui dirige la réparation vers la RH ou la SSA (Symington and Gautier, 2011 ; Sturzenegger et al., 2014). Des kinases dépendantes de cyclines (CDKs) phosphorylent CtIP ce qui favorise son interaction avec BRCA1 pendant les phases S/G2 (Huertas and Jackson, 2009) et de déplacer 53BP1, inhibant ainsi le c-NHEJ (Bunting et al., 2010).

Ainsi le principal facteur qui détermine le choix entre les voies est l'extension de la résection des extrémités cassées, mineure dans le cas du c-NHEJ et croissante lors du Alt-EJ, SSA à la RH (Zhao et al, 2020) et sa régulation au cours du cycle cellulaire.

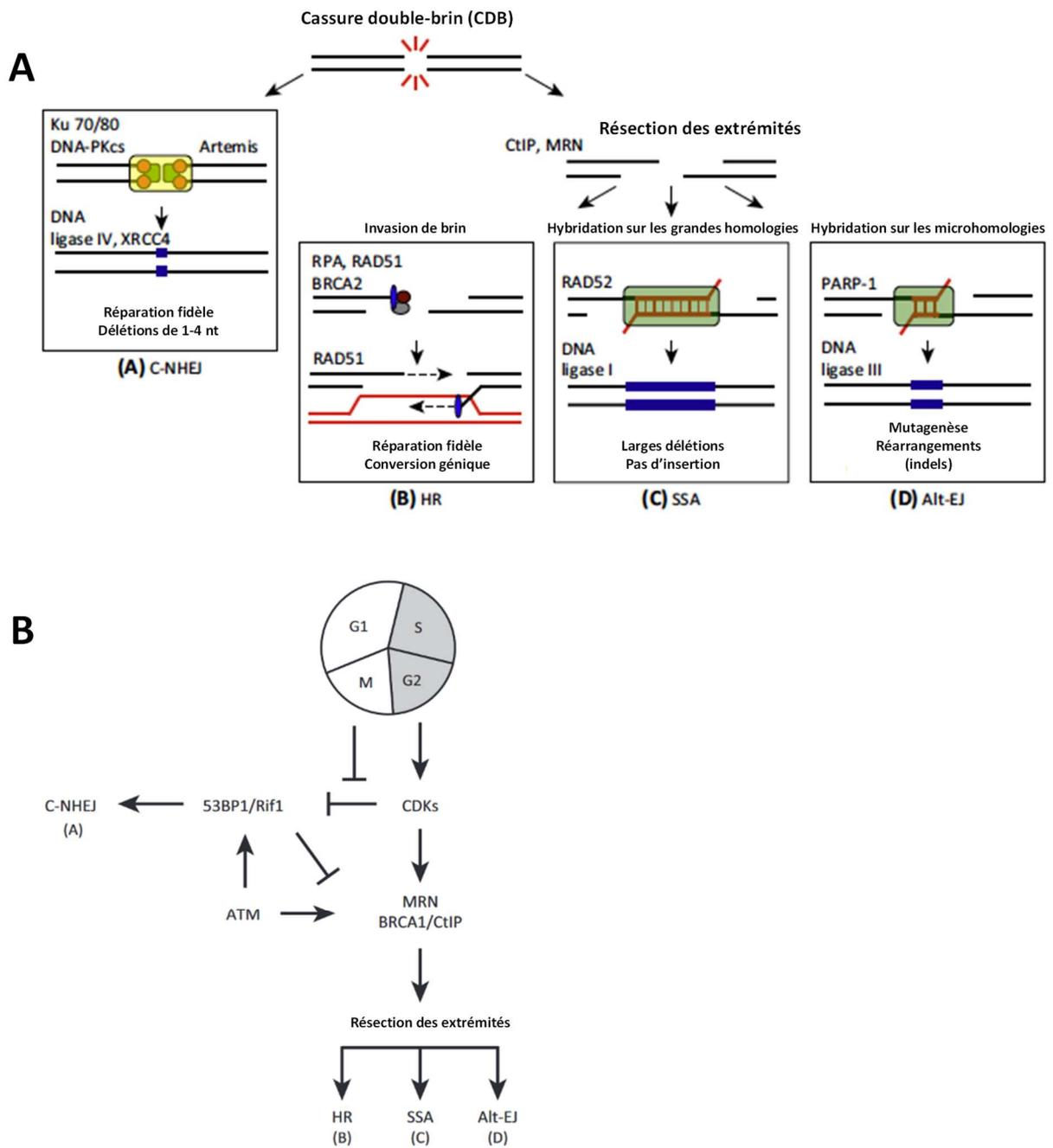


Figure 8 : (A) Quatre voies de réparation des cassures double brin (CDB) de l'ADN. (A-D) Le choix de la voie de réparation des CDB de l'ADN dépend principalement de l'existence ou non d'une résection de l'extrémité de l'ADN. Lorsque la résection est bloquée, la réparation par c-NHEJ est favorisée. Cependant, lorsque la résection de l'ADN a lieu, trois voies (RH, Alt-EJ et SSA) peuvent entrer en compétition pour la réparation des CDB. En effet, il existe deux niveaux de compétition pour la réparation des CDB. Dans un premier temps, à l'étape de la résection, le c-NHEJ entre en compétition avec les voies dépendantes de la résection.

Ensuite, une fois que la résection a eu lieu la RH, l'alt-EJ et le SSA peuvent entrer en compétition pour la réparation. Chacune des quatre voies de réparation conduit à des modifications génétiques (conversion génique, délétions, insertions) et la fidélité du mécanisme de réparation est mentionnée pour chaque voie. nt, pour nucléotides. **(B)** Mécanismes régulant la résection des extrémités de l'ADN dans les cellules de mammifères et leur influence sur le choix de la voie de réparation des cassures. Le cycle cellulaire contrôle la compétition entre le c-NHEJ et les voies de réparation dépendantes de la résection (RH, Alt-EJ, SSA). La résection étendue est stimulée dans la phase S/G2 du cycle cellulaire et dépend de l'activité de la CDK, qui induit la phosphorylation de composants du complexe MRN et de CtIP. Dans la phase G1 du cycle cellulaire, les protéines 53BP1 et RIF1 se localisent aux CDB, inhibent le recrutement de BRCA1, bloquent la résection des extrémités de l'ADN et favorisent ainsi le c-NHEJ. Dans les phases S et G2 du cycle cellulaire, la kinase ATM, qui phosphoryle le complexe MRN, BRCA1, CtIP ou BLM, favorise les trois voies de réparation des DSB dépendantes de la résection (RH, Alt-EJ ou SSA). Cependant, des études suggèrent que Alt-EJ pourrait se produire en G1. Abréviations : ATM, Ataxia Telangiectasia Mutated ; CDK, cyclin-dependent kinase. (Figures traduites de Ceccaldi et al., 2016).

iii. La voie du c-NHEJ

Le c-NHEJ est la voie préférentiellement utilisée pour réparer les CDB dans la plupart des systèmes eucaryotes (~75% des événements de réparation des CDB en cellules humaines), puisqu'elle est active pendant une grande partie du cycle cellulaire (dominant dans les phases G0/G1 et G2 du cycle (Chiruvella et al., 2013; Karanam et al., 2012)). Des études en cellules humaines montrent aussi que la réparation par c-NHEJ est plus rapide que ne l'est celle par recombinaison homologue, avec le c-NHEJ qui se produit en moins de 30 minutes, tandis que la RH peut prendre jusqu'à 7 heures (Mao et al., 2008; Kowalczykowski, 2015). Elle permet de réparer des CDB présentant des extrémités franches ou de courtes extensions d'ADN simple brin libres (Dynam and Yoo, 1998).

Plus précisément, les extrémités d'ADN double brin sont reconnues et protégées par les protéines Ku70 et Ku80 formant un hétérodimère. Ce dimère est capable de former un

complexe, appelé DNA-PK, avec la protéine kinase dépendante de l'ADN, DNA-PKcs, qui joue le rôle de sous-unité catalytique du complexe. Ce complexe sert de plateforme de recrutement pour les autres protéines du complexe c-NHEJ comme les filaments protéiques de XRCC4 et XLF (Chiruvella et al., 2013). Les deux extrémités sont rapprochées grâce à l'hétérodimère Ku70-Ku80, ainsi que les filaments protéiques de XRCC4 et XLF (Mahaney et al., 2013). Pour être reliées, les extrémités au niveau des sites de cassure doivent être nettes. La nucléase Artemis peut alors intervenir pour supprimer quelques bases ou la polymérase Polμ pour en synthétiser. Ainsi la ligase 4 peut jouer son rôle dans la ligation des deux extrémités (Ceccaldi et al., 2016).

Le c-NHEJ n'est pas une voie mutagène et ne génère intrinsèquement pas de mutations mais c'est une voie de réparation des CDB versatile et adaptable qui peut toutefois résulter en des mutations si les extrémités à ligaturer sont imparfaites, par exemple si les bases sont modifiées ou s'il y a des tige-boucles d'ADN (« hairpin »). Dans le cas où les extrémités sont imparfaites, une étape de modification des extrémités est nécessaire, pour restaurer des extrémités ligaturables. Ainsi la précision du c-NHEJ est dictée par la nature des extrémités à réparer plutôt que par sa machinerie (Bétermier et al., 2014). Ainsi, selon le type de CDB et la complexité des extrémités, le c-NHEJ s'accompagne de courtes délétions de 0 à 14pb ou d'insertions, aussi appelés indels (Lieber, 2010).

iv. La voie de la recombinaison homologue (RH)

Le recours à la RH est maximal dans la moitié de la phase S et la moitié de la phase G2 (Karanam et al., 2012). Cette voie permet une réparation fidèle et nécessite l'invasion d'un brin homologue au niveau du site de cassure. Le brin homologue provient d'une chromatide sœur ou d'un chromosome homologue qui sert alors de matrice pour la réparation. Le complexe MRN va initier avec CtIP la résection des extrémités 5' qui se poursuit avec EXO1, DNA2 et BLM et libère ainsi des extrémités d'ADNsb 3' sortantes, qui seront recouvertes de RPA. RPA protège alors l'ADN et joue un rôle d'arrimage pour de nouvelles protéines comme Rad52 et BRCA2 qui permettent le recrutement de la recombinaise Rad51 sur l'ADNsb qui remplace la protéine RPA. Rad51 forme alors un nucléofilament protéique qui recherche une

séquence homologue à l'ADNsb sur le chromosome homologue ou la chromatide sœur (Krejci et al., 2012). Lorsque la séquence homologue est trouvée, l'invasion de l'ADNsb homologue par l'ADNsb qui forme une D-Loop est catalysée par Rad51. Cela résulte en un échange de brin et libération d'ADNsb qui sert de matrice à des polymérases qui vont synthétiser et reconstituer l'ADN au voisinage du site de cassure. L'entrecroisement des brins d'ADN génère des jonctions de Holliday qui sont résolues par des hélicases comme la protéine BLM. Plusieurs voies de résolution des jonctions de Holliday sont possibles et peuvent mener à la génération ou non de crossing-over, et l'échange de matériel génétique qui peut mener à de la conversion génique et donc la perte d'hétérozygotie (Krejci et al., 2012).

v. Les voies Alt-EJ et SSA

Comme pour la RH, la réparation par les voies Alt-EJ et SSA démarre par la résection des extrémités 5', mais de façon moins extensive. Mais contrairement à la RH, les voies Alt-EJ et SSA sont intrinsèquement mutagènes.

L'Alt-EJ est souvent réduit à une seule voie appelée jonction d'extrémités orientée par microhomologie (ou MMEJ pour « Microhomology-Mediated End Joining »), bien qu'elle ne soit pas la seule voie alternative au c-NHEJ. Je me focaliserai donc uniquement sur le MMEJ.

Cette voie permet la réparation par ligation d'extrémités indépendamment des protéines Ku ou DNA ligase IV et implique de courtes séquences homologues de part et d'autre de la cassure, appelées microhomologies ; ces séquences sont à l'origine de délétions spécifiques, signatures de la mutagénicité de la voie MMEJ. La première étape est la reconnaissance de la cassure par PARP1, qui va permettre de recruter le complexe MRN. Les premières études chez la levure ont montré que l'Alt-EJ débute de la même manière que la RH, par la génération d'une incision sur les brins en 3' de la cassure par l'activité endonucléase de la sous-unité MRE11 du complexe MRN, activée par CtIP (Sae2 chez la levure *S. cerevisiae*) et dépendant de l'activité ATPase de Rad50 (Cannavo and Cejka, 2014). Ensuite l'activité exonucléase de MRE11 digère de 3' vers 5', en direction du site de cassure (Paull and Gellert,

1998). Puis l'exonucléase Exo1 plus processive, digère l'ADN depuis l'incision, vers la direction opposée au site de cassure. Ainsi sont générées des extrémités 3' d'ADNsb (Garcia et al., 2011). Cette activité implique aussi la protéine BLM ainsi que l'hélicase/nucléase ATP dépendante DNA2 (Sturzenegger et al., 2014). Mais contrairement à la RH, RPA est déplacée de l'ADN simple brin par l'activité hélicase de la polymérase θ (gène PolQ), protéine spécifique de la voie MMEJ, inhibant ainsi la RH et permettant l'hybridation des microhomologies. Puis après excision des extrémités 3' simple brin (ou flaps) et polymérisation par la polymérase Theta (gap filling) la DNA ligase 3 va procéder à la ligation des extrémités.

Dans la voie SSA, les deux brins complémentaires subissent de la même façon que pour RH et MMEJ, une résection de 5' vers 3', ce qui va exposer des régions simple brin contenant des séquences complémentaires d'au moins 25 nucléotides, incluses dans des régions répétées en tandem. Les ADNsb générés sont recouverts par RPA puis par Rad52. Comme pour le MMEJ. L'hybridation des séquences complémentaires laisse des extrémités 3' libres qui sont éliminées, puis les nucléotides manquants sont synthétisés pour ensuite donner lieu à la ligation des extrémités, probablement par la DNA ligase 1. Cette voie de réparation non conservative, génère des délétions intrachromosomiques, d'une des deux répétitions et de la séquence entre les répétitions, mais peut aussi générer des translocations induites par l'interaction des éléments répétés de chromosomes différents.

2. Les systèmes de réparation de l'ADN chez les tardigrades

Comme exposé dans le chapitre précédent, les tardigrades sont remarquablement résistants aux stress génotoxiques, probablement en raison d'une tolérance croisée acquise pour résister à la dessiccation, dont il a été montré qu'elle génère également de nombreux dommages à l'ADN (Neumann et al., 2009). Un échec de la réparation des dommages induits pendant leur état cryptobiotique pourrait altérer des processus biologiques essentiels comme la réplication ou la transcription. L'une des hypothèses avancées pour expliquer leur résistance aux dommages à l'ADN proviendrait de l'efficacité remarquable de leurs systèmes de réparation à l'état actif, lors de la réhydratation (Förster et al., 2012; Horikawa et al., 2013).

Toutefois peu d'études ont été menées sur les systèmes de réparation de l'ADN chez les tardigrades, bien qu'il s'agisse probablement d'un aspect très important de leur résistance aux stress génotoxiques. Récemment Kamilari et al. ont réalisé une analyse comparative globale entre des génomes d'eutardigrades (*R. varieornatus* et *H. exemplaris*), des transcriptomes de l'Eutardigrade *R. coronifer* et de l'hétérotardigrade résistant à la dessiccation *E. sigismundi* ainsi que de 6 autres espèces modèles eucaryotes (hors tardigrada) dont un représentant des arthropodes (*Drosophila melanogaster*), des nématodes (*Caenorhabditis elegans*) et 4 représentants des chordés dont *Homo sapiens*. De cette étude, ils ont réalisé un inventaire des voies de réparation retrouvées chez les tardigrades, révélant les expansions et pertes de gènes parmi les espèces étudiées (Kamilari et al., 2019). Cette étude a permis d'avoir une première vision des voies potentiellement sollicitées par certains tardigrades pour répondre aux dommages à l'ADN.

a. p53, le gardien du génome, est présent chez les eutardigrades

Les eutardigrades étudiés possèdent tous une version du gène p53, mais celui-ci semble absent dans le transcriptome de *E. sigismundi* (Kamilari et al, 2019). De plus, aucun gène de la famille p53 (p63/p73-like) n'a été retrouvé chez l'hétérotardigrade. p53 est un facteur de transcription essentiel souvent appelé « gardien du génome » qui régule de nombreux processus comme la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'apoptose et l'autophagie (Zhang and Lozano, 2017). Il est un acteur essentiel dans la protection contre les cancers (Van Dyke, 2007) et a été retrouvé chez toutes les espèces animales étudiées jusqu'ici. Il faut cependant prendre cette affirmation avec précaution, et des investigations supplémentaires et notamment l'accès à un génome assemblé de bonne qualité sont nécessaires pour affirmer son absence avec plus de robustesse chez les hétérotardigrades. Toutefois, si son absence est effectivement avérée, cela signifierait que la signalisation de la réponse aux dommages passe par un ou d'autres acteurs encore non identifiés.

b. Conservation des gènes du NER et réponses aux UV

Les résultats indiquent une conservation complète des voies du NER avec une expansion de certains gènes (e.g. CDK7, ERCC1, ERCC5). Le NER couplé à la transcription (TC-NER ou « Transcription-coupled NER ») est une voie du NER pour réparer les lésions que va rencontrer l'ARN polymérase lors de la transcription d'un gène actif (Duan et al., 2021). L'utilisation du NER serait alors en concordance avec le fait que les tardigrades, dont les cellules se divisent peu à l'exception de certains tissus (Czernekova and Jönsson, 2016), utilisent plutôt des voies de réparation de l'ADN indépendantes de la réplication.

Le NER est une voie importante qui permet d'éliminer les dommages générés par les UV comme les dimères de thymine par exemple (Rumora et al., 2008; Mullenders, 2018). Ainsi *R. varieornatus*, plus résistant aux UVC que *H. exemplaris* (Horikawa et al., 2013), possède 2 copies du gène XPC. La protéine XPC pourrait donc contribuer à la forte tolérance de *R. varieornatus* qui montre beaucoup moins de dimères de thymine sur son ADN en réponse aux UVC en comparaison de *H. exemplaris*. Toutefois *R. varieornatus* montre également une surexpression de la photolyase A (PhrA) 18h après exposition aux UVC. Cette expression revient à des niveaux normaux 112h post-exposition, quand tous les dommages sont réparés. PhrA est une photolyase de l'ADN qui répare les CPD (Cyclobutane Pyrimidin Dimers), des dimères de pyrimidines induits par exposition à de la lumière bleue (<300nm) en les ramenant à la forme monomérique par excision de nucléotides (Ng et al., 2000). La résistance de *R. varieornatus* aux UVC pourrait alors être expliquée par l'action conjointe de la réparation par NER et de PhrA.

c. Une expansion des gènes de la voie du BER chez les eutardigrades

Concernant la voie du BER, tous les tardigrades étudiés semblent posséder plus de gènes putatifs de cette voie que les autres animaux inclus dans l'analyse. C'est le cas de POLE (polymérase ϵ), qui présente en au moins une copie supplémentaire, voire 4 copies supplémentaires pour *R. coronifer* par rapport aux espèces non-tardigrades étudiées. De

manière générale, *R. coronifer* semble avoir plus de copies des familles de gènes impliqués dans le BER (POLE, FEN1, PARP1-4). Toutefois *E. sigismundi* (Heterotardigrada) semble manquer de POLB (polymérase β), tout comme *D. melanogaster* et *C. elegans* ainsi que du gène APTX (aprataxin), contrairement aux eutardigrades qui en possèdent 2 copies, soit plus que les autres espèces non-tardigrades comparées. Cela signifie que POLB a été perdu à plusieurs reprises au cours de l'évolution du super-embranchement des ecdysozoaires. L'hétérotardigrade étudié ne possède donc pas tout le panel de gènes du BER, ce qui pourrait éventuellement diminuer sa tolérance aux stress génotoxiques. Cette hypothèse est supportée par le fait que *E. sigismundi* présente une LD50_{24h} aux rayonnements γ bien inférieure à celles des eutardigrades (**Tableau 3.1**).

d. Une voie MMR similaire à celles des autres ecdysozoaires

Tous les ecdysozoaires analysés, tardigrades inclus, semblent manquer de la protéine MSH3 et l'hétérotardigrade semble manquer additionnellement de la protéine EXO1, mais cela reste à confirmer. Sinon ils possèdent les autres gènes impliqués dans la voie de réparation MMR, nécessaire à la réparation des dommages post-réplicatifs qui n'auraient pas été corrigés par l'ADN polymérase, ou les mésappariements issus de recombinaisons, indiquant que les tardigrades possèdent des outils similaires aux autres ecdysozoaires pour corriger les mésappariements. La voie du MMR est surtout sollicitée pour corriger les erreurs dues à la réplication, par conséquent, on peut s'attendre à ce que chez les tardigrades, qui présentent peu de division cellulaire, (Gross et al., 2018), cette voie ne soit pas d'importance primordiale pour leur résistance aux stress génotoxiques.

e. La réparation par End Joining est une voie de réparation active chez les eutardigrades

Pour répondre aux cassures double-brin, les eutardigrades possèdent tous les gènes essentiels du c-NHEJ à l'exception XRCC4 (X-Ray Cross-Complementing 4). En revanche, les tardigrades étudiés ne semblent pas posséder la DNA Ligase 3 (LIG3) mais la DNA Ligase 1 est présente. *R. varieornatus* semble posséder une copie de LIG4 de plus que *H. exemplaris*,

bien que Kamilari et al. rapportent respectivement 3 et 2 copies pour *R. varieornatus* et *H. exemplaris*, tandis que Carrero et al. indiquent avoir trouvé 2 et 1 copies respectivement par séquençage Sanger ou RNASeq. Les ligases (LIG1, LIG3, LIG4) sont des protéines essentielles durant la réplication et la réparation et chez l'Homme, des mutations de la LIG4 sensibilisent les cellules aux radiations ionisantes et altèrent leur croissance (Barazzuol and Jeggo, 2016; Carrero et al., 2019). La présence d'une copie supplémentaire de LIG4 chez *R. varieronatus* pourrait être une piste pour expliquer sa grande résistance. D'un autre côté l'hétérotardigrade *E. sigismundi* semble manquer de l'intégralité des gènes essentiels du c-NHEJ et de 53BP1, protéine se liant à p53 et essentielle pour promouvoir le c-NHEJ, en concordance avec l'absence de p53 chez *E. cf sigismundi*. Il a été montré expérimentalement que chez plusieurs tuniciers comme *Oikapleura dioica*, l'absence de c-NHEJ est compensée par l'utilisation d'autres gènes conservés comme PARP1, MRE11, XRCC1, RAD50, et LIG1, potentiellement par un mécanisme alternatif de c-NHEJ comme le MMEJ (Deng et al., 2018). Ces gènes sont également présents chez *E. cf sigismundi*. Comme évoqué à plusieurs reprises, cet hétérotardigrade est drastiquement moins tolérant aux rayonnements ionisants à faible TEL que tous les eutardigrades testés, et cela pourrait signifier que le c-NHEJ est une voie indispensable chez les tardigrades pour expliquer leur radiotolérance.

Des données récentes ont montré que le c-NHEJ était probablement sollicité chez *H. exemplaris* pour réparer des CDB induites par le système CRISPR/Cas9 après injection (éventuellement suivie d'une électroporation) du complexe ribonucléoprotéique Cas9 en présence d'ARN guides dirigés contre le gène de l'hémerythine ou le gène Dsup (HeDsup). Après injection et électroporation de deux ARN guides ciblant chacun des deux gènes, une délétion correspondant exactement à la ligation des deux extrémités coupées par le système CRISPR est générée, la réparation des CDB se fait systématiquement par un phénomène de ligation des extrémités qui ne génère aucune mutation supplémentaire au niveau des sites de cassure (Kumagai et al., 2022). Le c-NHEJ n'est pas une voie mutagène et si la réparation des CDB générées par le système CRISPR/Cas9 produit exactement la délétion correspondant aux sites de cassures chez *H. exemplaris*, cela est compatible avec le fait que les extrémités générées par le système CRISPR Cas9 sont simples et pourrait de plus

suggérer que *H. exemplaris* protège ses extrémités d'ADN cassées en préparation de la réparation par le c-NHEJ comme je le décrirai plus bas (dans la partie 3.e). En effet ce phénomène a aussi été observé en cellules humaines mais avec un taux de délétion "exacte" un peu plus faible que dans cette étude chez le tardigrade (Kumagai et al., 2022).

f. La recombinaison homologue est présente mais certains acteurs essentiels sont manquants

Enfin chez tous les tardigrades étudiés, de nombreux gènes de la recombinaison homologue semblent présents à l'exception de certains pourtant essentiels chez l'Homme. Cette voie est probablement active chez certains tardigrades, comme l'a montré l'induction de la recombinase de la RH Rad51 chez *M. inceptum* en réponse à une dose de rayonnements γ de 70 Gy (Beltrán-Pardo et al. 2013). Toutefois certains gènes d'initiation de la résection par le complexe MRN semblent absents, en effet aucun homologue de NBS1 n'a été retrouvé ni chez les eutardigrades, ni chez les hétérotardigrades *E. cf sigismundi* ou *E. testudo* (Murai et al., 2021). *E. sigismundi* semble manquer de SLX1 et SLX4, normalement impliqués dans la résolution des jonctions de Holliday, mais aussi des protéines EXO1 et MLH3, indiquant qu'il ne possède pas de système connu de résolution des jonctions, ce qui pourrait suggérer un mécanisme inconnu de résolution des jonctions, différent de celui des eutardigrades. Chez *R. varieornatus*, on retrouve 4 copies de MRE11, soit 2 fois plus que *R. coronifer* et 4 fois plus que *H. exemplaris* et *E. sigismundi*, ce qui suggère un rôle important de cette protéine dans la remarquable résistance de *R. varieornatus*.

Il serait intéressant de comprendre comment les voies de la RH fonctionnent chez les tardigrades, surtout en l'absence d'acteurs primordiaux tels que NBS1. Sont-ils remplacés par des acteurs jouant le même rôle qu'eux ou bien cela passe-t-il par des systèmes complètement différents ?

Le nombre d'études limité sur les systèmes de réparation de l'ADN ne permet pas de conclure sur une efficacité particulière de leur mécanisme et d'autres recherches sont

nécessaires. Toutefois, d'autres hypothèses sont émises pour expliquer leur tolérance aux stress génotoxiques, notamment l'existence de mécanismes de protection du génome.

3. Dsup : un acteur de la résistance aux stress génotoxiques

Parmi les mécanismes originaux développés par certaines espèces de tardigrades, Dsup est un acteur qui a suscité le plus d'attention récemment. Partant du principe que les tardigrades sont extraordinairement résistants aux radiations ionisantes dont l'ADN est une cible, Hashimoto et al. ont émis l'hypothèse qu'il existait des protéines uniques aux tardigrades associées à l'ADN et qui le protégeaient et/ou le réparaient de manière efficace. Pour explorer cette possibilité, ils ont isolé une fraction chromatiniennne du tardigrade très résistant à la dessiccation *R. varieornatus*, dont ils ont analysé les protéines par spectrométrie de masse. Après identification de ces dernières et leur expression hétérologue en fusion GFP en cellules de drosophile, ils ont identifié une protéine qu'ils ont baptisée Dsup pour « Damage Suppressor » colocalisée avec l'ADN nucléaire et cette localisation a été confirmée par analyse immunohistochimique d'embryons de *R. varieornatus*. Par ailleurs, une analyse transcriptomique des embryons de ce même tardigrade a montré que Dsup était parmi les 100 gènes les plus exprimés durant la phase embryonnaire, ce qui pourrait suggérer que la réplication intensive de l'ADN pendant ces phases précoces nécessite une protection particulière chez ces animaux souvent exposés aux stress génotoxiques (Hashimoto et al., 2016b). Une autre propriété intéressante concernant Dsup qui sera détaillée plus loin, est sa capacité à conférer à des cellules humaines en culture, une tolérance aux rayonnements X quasiment doublée. Dsup est un exemple représentatif d'une innovation unique aux tardigrades qui pourrait expliquer leur résistance, et en ce sens, il est possible que les tardigrades aient développé des mécanismes de tolérance uniques et originaux durant l'évolution, rendant ces espèces pertinentes à étudier pour comprendre les mécanismes moléculaires de tolérance aux stress extrêmes. Ces mécanismes pourraient par ailleurs inspirer d'éventuelles applications biotechnologiques, par transfert de ces capacités à d'autres organismes moins tolérants par exemple.

Dans cette partie j'exposerai l'état de la connaissance concernant cette protéine Dsup, à commencer par sa présence potentielle chez d'autres espèces de tardigrades, puis je décrirai les effets protecteurs à l'ADN qu'elle confère *in vivo* et *in vitro*, ainsi que ses cibles d'interaction moléculaire. Enfin je discuterai de sa structure et du mécanisme potentiel qui pourrait expliquer son effet protecteur contre les stress génotoxiques.

a. Une protéine présente chez *H. exemplaris*

La comparaison de la séquence de Dsup aux bases de données disponibles n'a montré que très peu de similarités à des protéines ou motifs connus, renforçant l'idée que cette protéine est unique aux tardigrades. Néanmoins un orthologue potentiel a été identifié chez l'espèce *H. exemplaris* malgré la faible identité (26,4%) et similarité (35,5%) entre les deux séquences protéiques (Hashimoto et al., 2016b). Cette identification repose sur la conservation de la synténie après examen des régions chromosomiques entourant les deux gènes chez les deux espèces (Chavez et al., 2019). D'autres indices laissent penser que le Dsup-like de *H. exemplaris* HeDsup (328 acides aminés) est homologue à celui de *R. varieornatus* RvDsup (445 acides aminés), comme la présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) en région C-Terminale, la stricte conservation de motifs courts et un profil de charge et d'hydrophobicité similaire au Dsup de *R. varieornatus*. Je reviendrai sur les aspects suivants plus en détail lorsque j'évoquerai la relation entre structure et fonction de la protéine Dsup (Hashimoto et al., 2016b). L'existence d'un Dsup potentiel chez un *H. exemplaris*, suggère qu'il pourrait être présent aussi chez d'autres tardigrades et qu'il pourrait expliquer la tolérance remarquable de certaines de ces espèces.

Afin de différencier les Dsup issus de ces deux organismes, je nommerai le Dsup de *R. varieornatus* par RvDsup et celui de *H. exemplaris* par HeDsup et j'utiliserai le terme général de Dsup lorsque je souhaite mentionner l'ensemble des protéines Dsup toutes espèces confondues.

b. Un effet protecteur contre les rayonnements ionisants et les radicaux libres *in vivo*

Comme évoqué au début de cette partie, Dsup semble protéger contre les dommages à l'ADN. En effet des cellules humaines HEK 293-T transfectées avec Dsup ont montré une fragmentation de leur ADN 40% inférieure à des cellules non transfectées après un traitement aux rayons X (~4Gy) ou au peroxyde d'hydrogène. Afin de valider ces résultats, Hashimoto et al. ont compté et comparé le nombre de foyers γ -H2AX entre les noyaux de cellules exprimant ou non Dsup. Le variant d'histone H2AX est recruté et phosphorylé au niveau des sites de cassures double-brin (il devient alors γ -H2AX), et apparaît sous forme de foci lorsqu'il est révélé par cyto-immunofluorescence. La quantification de ces foyers γ -H2AX peut alors être utilisée en tant qu'indicateur de CDB. Ainsi les noyaux des cellules transfectées avec Dsup montrent moins de foyers que les contrôles (Hashimoto et al., 2016b). Afin de trancher entre l'hypothèse d'une radioprotection ou d'une réparation améliorée conférée par Dsup, les auteurs ont irradié les cellules dans la glace et les ont immédiatement soumises à un test des comètes afin de détecter la fragmentation de l'ADN avant que des processus de réparation ne s'enclenchent. Ainsi, ils ont conclu que le nombre de foyers réduit dans les cellules exprimant Dsup était probablement due à la protection contre les dommages à l'ADN, plutôt qu'à une amélioration des processus de réparation de l'ADN (Hashimoto et al., 2016b).

De plus l'effet radioprotecteur de Dsup a été démontré par analyse de la viabilité et de la prolifération des cellules transfectées par Dsup ou non, après irradiation aux rayons X. La prolifération des cellules non transfectées étant abolie tandis que les cellules exprimant Dsup ont une viabilité significativement supérieure aux cellules non transfectées et leur prolifération n'est pas interrompue.

Par ailleurs, l'expression de Dsup dans des plants de tabac de *Nicotiana tabacum* leur confère une croissance et survie accrues en réponse à des agents mutagènes ou des radiations. Par des tests des comètes, les auteurs ont montré que les plants exprimant Dsup gardent plus

de noyaux intacts que les plants contrôles. Les plants exprimant Dsup présentent un profil d'expression de gènes endogènes différent des plants contrôles en réponse aux traitements génotoxiques. On observe notamment une sous-expression par rapport au contrôle du gène ATR impliqué dans la signalisation des dommages, en accord avec le fait que les plants Dsup présentent moins de dommages dans leur génome (Kirke et al., 2020).

Enfin la transformation bactérienne de *E. coli* avec Dsup ou RecA ou uvrD (deux gènes impliqués dans la survie aux irradiations de la bactérie radiotolérante *Deinococcus radiodurans* (Narasimha and Basu, 2021)) montre que les bactéries exprimant Dsup ont une survie accrue par rapport au contrôle, tandis que les bactéries exprimant RecA et uvrD ne montrent pas d'amélioration dans la survie (Puig et al., 2021).

L'ensemble de ces expériences montre que Dsup offre un effet protecteur contre l'introduction de dommages *in vivo* en expression hétérologue. Dsup semble pouvoir exercer son rôle malgré son expression dans un système biologique éloigné des tardigrades, et donc semble avoir une fonction autonome ne nécessitant pas des acteurs spécifiquement présents chez les tardigrades. Il serait important de confirmer ces résultats par des expériences de perte de fonction chez le tardigrade, par exemple par interférence par ARN de Dsup ou par génération de lignées KO pour Dsup, afin de vérifier si leur radiotolérance est conservée.

c. Dsup protège de la dégradation de l'ADN par des radicaux libres *in vitro*

In vitro, de l'ADN libre ou des nucléosomes mis en présence de Dsup en concentration croissante montrent une dégradation diminuée en présence de radicaux hydroxyle. La dégradation diminue quand le ratio Dsup : ADN augmente. Toutefois, quels que soient les ratios testés (jusqu'à 6 : 1 de ratio Dsup : ADN), de la fragmentation est observée en comparaison des contrôles non traités aux radicaux hydroxyles. L'effet protecteur est plus flagrant sur les nucléosomes que sur l'ADN libre, peut-être parce que Dsup a une plus forte affinité pour les nucléosomes (voir plus bas, partie d, ii). Dans cette expérience, les essais

avec RvDsup montrent moins de fragmentation de l'ADN qu'avec HeDsup bien que les deux diminuent la fragmentation. RvDsup semble par conséquent avoir un pouvoir protecteur plus fort que HeDsup contre les radicaux hydroxyle *in vitro* (Chavez et al., 2019).

d. Domaines fonctionnels de Dsup : interaction avec l'ADN et effet protecteur

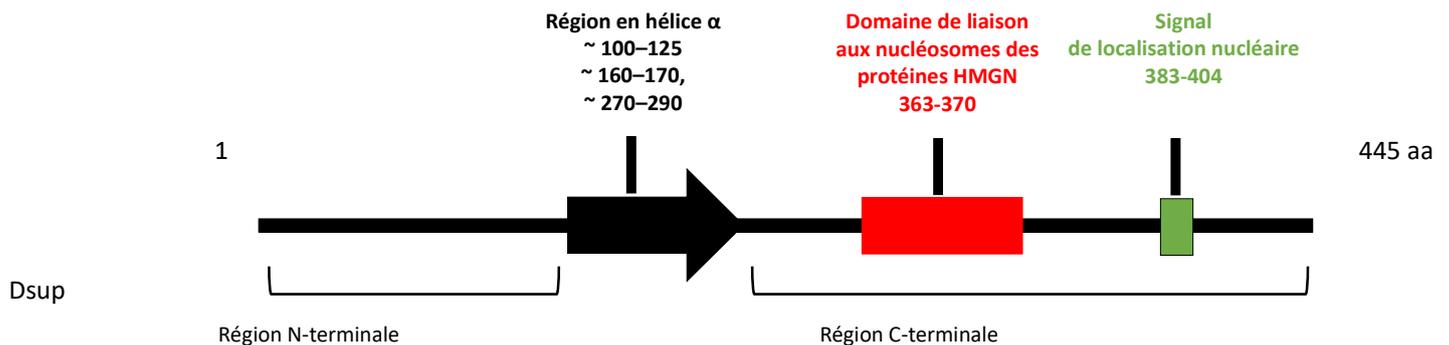


Figure 9 : Structure schématique de la protéine RvDsup (445 acides aminés). La flèche indique une région prédite en hélice α dans la région centrale de la protéine et le rectangle noir dans la région C-Terminale indique la séquence de localisation nucléaire. (Tiré et modifié de Hashimoto and Kunieda, 2017, Mínguez-Toral et al. 2020).

i. Un domaine de liaison à l'ADN : la région C-Terminale

Hashimoto et al. ont montré *in vitro* que la région C-Terminale de RvDsup (**Figure 9**), riche en acides aminés basiques, était requise et suffisante pour interagir avec l'ADN, et également nécessaire pour colocaliser avec l'ADN dans des cellules transfectées. Par ailleurs, la diminution de fragmentation de l'ADN n'est plus observée dans les cellules transfectées avec RvDsup tronqué de sa région C-Terminale, suggérant que son association avec l'ADN est nécessaire pour protéger l'ADN contre les rayons X. La région C-Terminale exprimée seule (RvDsup-C) colocalise également avec l'ADN, mais induit une agrégation anormale de l'ADN et empêche la génération de lignées stables. Cela évoque que cette association non-spécifique de RvDsup-C avec l'ADN interfère avec les processus réplcatifs ou

transcriptionnels des cellules, empêchant ainsi leur croissance normale (Hashimoto et al., 2016b; Hashimoto and Kunieda, 2017).

La modélisation computationnelle de l'interaction entre Dsup et l'ADN par Mínguez-Toral et al. suggère que Dsup peut interagir avec l'ADN grâce la seule force de l'attraction électrostatique entre les charges positives des acides aminés basiques de Dsup et les charges négatives des phosphates de l'ADN. Ceci suggère que Dsup peut se lier à l'ADN de manière non spécifique de séquence, comme observé expérimentalement et décrit précédemment. La région C-Terminale, chargée positivement est celle qui montre le plus de contacts avec le double-brin (Mínguez-Toral et al., 2020), ce qui est en accord avec le fait que son expression transitoire en cellules est suffisante pour interagir avec l'ADN comme décrit plus haut (Hashimoto et al., 2016b).

ii. Un motif de liaison aux nucléosomes

De plus, les régions C-Terminales des Dsup contiennent un motif strictement conservé qui s'apparente à un domaine de liaison aux nucléosomes des protéines HMGN. Ces protéines qui font partie du High mobility group (HMG)-N sont une famille de petites protéines qui se lient aux nucléosomes mais qui ne sont pas des histones. Elles peuvent se lier à des sites de haute affinité présents sur les nucléosomes, indépendamment de la séquence d'ADN (Nanduri et al., 2020). La délétion ou la mutation de ce domaine HMGN-like de Dsup mène à une forte diminution de l'interaction avec les nucléosomes *in vitro*.

Chavez et al. ont montré *in vitro* que Dsup, pour les deux espèces, a une plus grande affinité pour l'ADN nucléosomal que pour l'ADN nu. Il s'incorpore de manière périodique dans les nucléosomes, sans perturber leur assemblage avec l'ADN lors des tests d'assemblage de la chromatine *in vitro* en présence du moteur protéique dépendant de l'ATP ACF qui catalyse l'assemblage chromatinien (« ACF-mediated chromatin assembly »). Il semble également pouvoir interagir *in vitro* avec les nucléosomes même en présence de l'histone H1, et pourrait potentiellement fonctionner de manière conjointe avec cette histone. Dans des expériences de gel retard, où des protéines Dsup sont mises en présence de nucléosomes,

2 bandes sont observables, une minoritaire et l'autre majoritaire. La bande minoritaire représente un ratio Dsup : nucléosome de 1 :1 tandis que la bande majoritaire, qui semble augmenter avec la concentration Dsup, pourrait correspondre à un ratio 2 :1 (Chavez et al., 2019). L'affinité préférentielle *in vitro* des Dsup pour les nucléosomes en comparaison de l'ADN libre a mené les auteurs à spéculer que ces protéines pouvaient potentiellement former une structure plus résistante avec les nucléosomes.

iii. Des domaines intrinsèquement désordonnés

L'analyse des séquences des Dsup ainsi que leur modélisation par analyse computationnelle ont permis d'observer qu'elles possédaient de nombreuses régions désordonnées faisant d'elles des protéines intrinsèquement désordonnées (PID). Elles sont enrichies en acides aminés du type sérine, alanine, glycine et lysine (SAGK). RvDsup possède plus de 60% de résidus du type SAGK et HeDsup en contient plus de 50% (Hashimoto et al., 2016b; Mínguez-Toral et al., 2020). Ces acides aminés sont souvent retrouvés dans les protéines désordonnées. Les protéines désordonnées ne possèdent pas de structure tridimensionnelle stable, et il est suggéré que cela pourrait leur conférer la capacité à résister à des conditions biochimiques défavorables, comme la dessiccation (Boothby and Pielak, 2017). En effet, les PID sont connues pour être capables de rester stables à haute température ou en conditions très acides ou de récupérer rapidement leur fonction après un stress (Battaglia et al., 2008; Janis et al., 2018). De plus, le désordre intrinsèque est retrouvé chez de nombreuses protéines interagissant avec l'ADN et l'ARN comme les facteurs de transcription (Garvie et al., 2002) ou les histones (Oliver and Denu, 2011a, 2011b). Ces observations suggèrent que ce désordre intrinsèque fait que Dsup ne possède pas de conformation propre mais un ensemble de conformations dynamiques variables qui lui permettent d'avoir une structure flexible qui s'adapte à l'ADN (Mínguez-Toral et al., 2020).

Par ailleurs, les Dsup possèdent deux motifs conservés, et le second se positionne plus proche de l'ADN par analyse computationnelle et est prédit pour avoir une structure d'hélice α . Il n'est similaire à aucun motif connu et est chargé positivement, ce qui renforce l'hypothèse de son interaction avec l'ADN. Les auteurs suggèrent que ce motif pourrait avoir

un rôle structural de « switch » entre une forme désordonnée et ordonnée qui s'activerait quand Dsup interagit avec l'ADN. Les auteurs suggèrent que Dsup se structure autour de la double-hélice indépendamment de la conformation de l'ADN grâce à sa flexibilité intrinsèque et pourrait former un bouclier qui protège à la fois l'ADN et les nucléosomes (Mínguez-Toral et al., 2020), ce qui est concordant avec les expériences de Chavez et al (Chavez et al., 2019).

e. Mécanisme protecteur proposé

L'hypothèse a été faite que l'effet protecteur de Dsup proviendrait de sa capacité à bloquer l'accès au petit sillon de la double-hélice aux ERO en formant un bouclier selon le modèle proposé dans la **figure 10** (Chavez et al., 2019). Dans ce modèle, Dsup se lie spécifiquement aux nucléosomes et protège l'ADN en couvrant la chromatine avec ses régions désordonnées enrichies en acides aminés du type SAGK, conformément à sa flexibilité prévue par l'analyse computationnelle décrite plus haut. Bien que les preuves manquent, Dsup pourrait également avoir un effet protecteur en absorbant l'impact des particules chargées qui viennent à se rencontrer et ainsi réduire les occurrences d'ionisation directe de l'ADN (Mínguez-Toral et al., 2020).

Il faut toutefois noter que la majorité des expériences pour proposer ce modèle ont été réalisées *in vitro* avec des tests biochimiques et *in silico*, et il serait nécessaire de réaliser davantage d'expériences *in vivo*, ainsi que des études structurales du complexe Dsup-ADN pour confirmer ou invalider ce modèle.

Par ailleurs, si Dsup protège effectivement bien l'ADN, on pourrait faire l'hypothèse que l'absence d'indels lors la production d'une délétion par le c-NHEJ après induction de deux cassures chez *H. exemplaris* comme évoqué dans la partie (II.B.2.e) serait la conséquence de la protection des extrémités libres à ligaturer par Dsup, en attendant la réparation par le c-NHEJ (Kumagai et al., 2022).

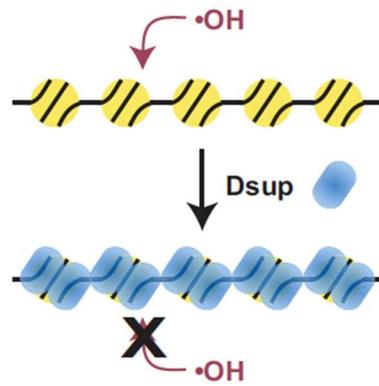


Figure 10 : Modèle proposé dans lequel Dsup se fixe aux nucléosomes et protège l'ADN chromatinien des radicaux libres. Dans ce modèle, Dsup se lie spécifiquement aux nucléosomes et protège l'ADN des agents génotoxiques comme les radicaux hydroxyles, en couvrant la chromatine avec ses régions désordonnées enrichies en acides aminés du type SAGK. (Figure de Chavez et al., 2019).

C. Radiotolérances remarquables au sein des eucaryotes

Au cours de l'évolution certains organismes ont développé des stratégies de survie et de colonisation de milieux dits extrêmes. Ces environnements très inhospitaliers peuvent présenter des conditions telles qu'une forte pression, une forte salinité, de fortes variations de températures, la dessiccation, d'intenses rayonnements UV ou ionisants.

Afin de comparer les différentes stratégies adoptées par le monde du vivant à celles des tardigrades, je décrirai ici le cas de certaines espèces remarquablement radiorésistantes, les rotifères bdelloïdes et la mouche *Polypedilum vanderplanki*.

1. L'exemple des rotifères bdelloïdes

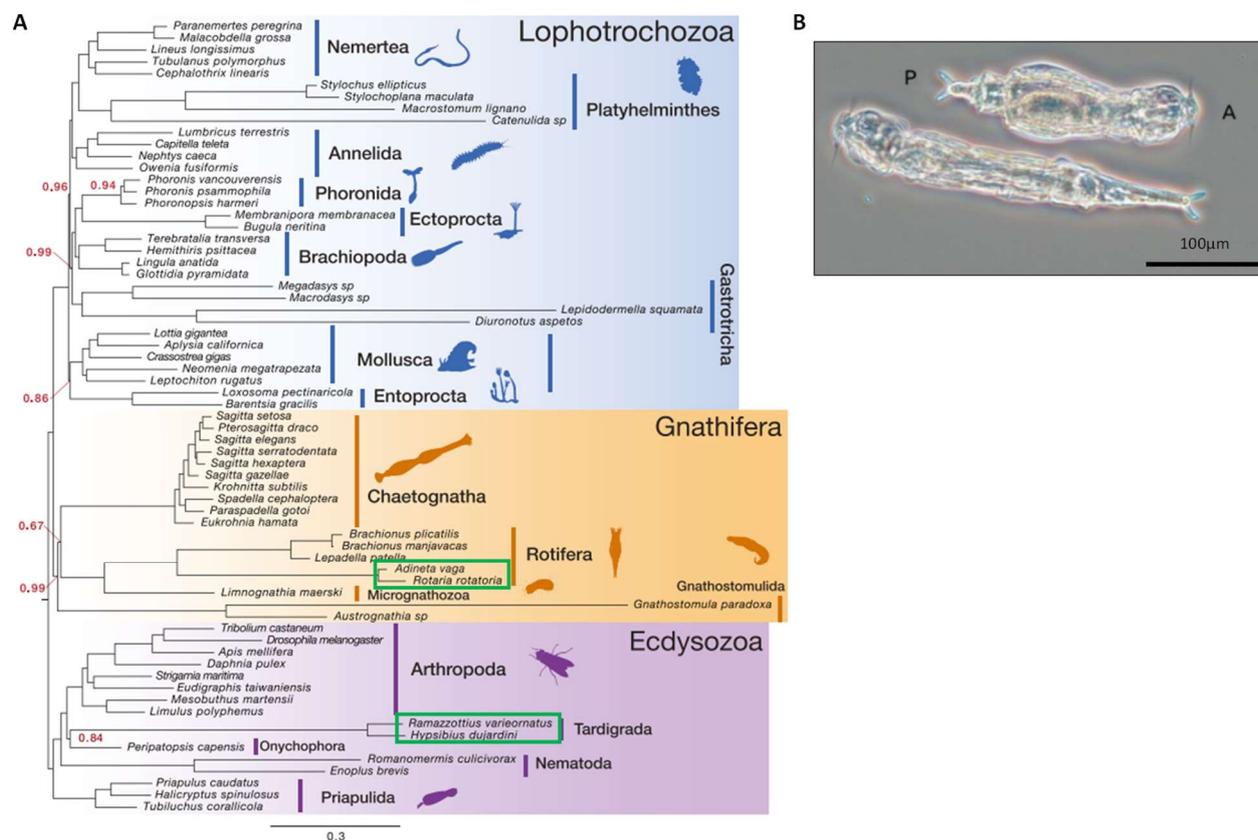


Figure 11 : (A) Résumé des relations au sein des métazoaires. Les taxons Tardigrada et Rotifera sont encadrés en vert. Il est à noter que *Hypsibius dujardini* prend désormais le nom de *Hypsibius exemplaris*. (B) Morphologie du rotifère bdelloïde *Adineta steineri*. L'axe antéro-postérieur est indiqué (A-P). Images modifiées de Marlétaz et al., 2019 ; Nowell et al., 2021.

a. Présentation générale des rotifères

Les rotifères sont de petits métazoaires dont la taille ne dépasse généralement pas 1000µm et dont le nombre de cellules est fixe à l'état adulte (~1000 cellules). Ce sont des organismes complexes qui possèdent un système musculaire, nerveux, digestif et excrétoire complet. L'embranchement des rotifères (autrement appelé Syndermata) se situe dans le super-embranchement des platyzoaires et il est relativement éloigné du super-embranchement des ecdysozoaires (**Figure 11 A**) (Edgecombe et al., 2011). Malgré tout, ces deux taxons présentent de nombreuses similarités en termes de taille, nombre de cellules et de milieu de vie avec les tardigrades. C'est notamment le cas du taxon des rotifères bdelloïdes (**Figure 11 B**), qui présentent de très nombreuses similarités avec les tardigrades limnoterrestres, à commencer par les biotopes qu'ils colonisent. En effet, leur distribution biogéographique s'étend des pôles à l'équateur, ce qui en fait un clade cosmopolite (Ricci, 2017). Ils sont aussi adaptés à des environnements qui voient parfois se succéder périodiquement et de manière rapide des cycles d'humectation et de sécheresse, comme les mousses et lichens. Pour ce, à l'instar de nombreuses espèces d'eutardigrades, ils supportent la dessiccation et la réhydratation pendant toutes les étapes de leur cycle de vie et les individus matures peuvent entrer en anhydrobiose. Les bdelloïdes (~450 espèces décrites) sont seulement capables de reproduction asexuée par parthénogenèse (Mark Welch and Meselson, 2000).

b. Des animaux tolérants aux stress génotoxiques

Ils présentent également de nombreuses résistances à des conditions extrêmes et montrent notamment une grande tolérance aux rayonnements UV et ionisants (Ricci et al., 2005; Fischer et al., 2013; Jönsson and Wojcik, 2017). Cependant, aucune étude à ce jour n'a mesuré de doses létales de radiations ionisantes pour des rotifères bdelloïdes, mais Gladyshev et Meselson ont montré que les bdelloïdes *Adineta Vaga* et *Philodina roseola* à l'état hydraté survivent à des doses d'irradiations γ montant jusqu'à 1120Gy, mais pas le rotifère monogonte *Euchlanis dilatata* (Gladyshev and Meselson, 2008). Il est intéressant de noter que les rotifères monogontes, contrairement aux bdelloïdes ne sont pas résistants à la dessiccation et sont capables de reproduction sexuée.

c. Des mécanismes particuliers de tolérance aux stress génotoxiques

L'une des principales raisons de la résistance élevée des rotifères bdelloïdes aux dommages de l'ADN semble être la présence de mécanismes efficaces de réparation de l'ADN. Ces mécanismes permettent aux rotifères de réparer rapidement les dommages pouvant survenir sur leur ADN, contribuant ainsi à garantir que leur matériel génétique reste stable et fonctionnel. Le bdelloïde *Adineta vaga* possède de nombreux gènes de la réponse aux dommages à l'ADN, des gènes obtenus via transfert horizontal et des gènes présents en grand nombre de copies. Ces expansions de gènes sont retrouvées principalement dans les voies du c-NHEJ et du BER, deux voies qui peuvent réparer les dommages générés par les stress oxydatifs, comme les CDB et les modifications de bases (Hecox-Lea and Mark Welch, 2018).

i. Reconnaissance d'une grande variété de dommages et "nettoyage" d'extrémités par des protéines acquises par transfert horizontal

Chez *A. vaga*, on retrouve des enzymes qui peuvent reconnaître une large variété de substrats grâce à une variété de glycosylases et d'endonucléases qui ne sont pas ou peu présentes chez les métazoaires ou les eucaryotes. C'est le cas des enzymes Fpg (« formamidopyrimidine DNA glycosylase »), AlkD (« alkylpurine DNA glycosylase » et UVDE (« ultraviolet damage endonuclease »), très probablement acquises par transfert horizontal de gènes bactériens, d'archées ou de champignons.

Ensuite certaines autres protéines peuvent réparer des lésions qui bloquent l'accès aux extrémités d'ADN à des enzymes comme les ADN polymérase. Ce processus, aussi appelé « end repair » est essentiel pour "nettoyer" les extrémités et pour permettre la synthèse ou la ligation par les enzymes des voies de réparation du BER ou du c-NHEJ par exemple. C'est le cas de la Ligase K, potentiellement acquise par transfert horizontal qui pourrait augmenter

le « end repair », libérant ainsi les extrémités bloquées et améliorant la réparation et donc la résistance aux dommages oxydatifs (Hecox-Lea and Mark Welch, 2018).

Chez les tardigrades, on n'observe pas de transfert horizontal particulièrement élevé (2,3% chez *H. exemplaris*, (Yoshida et al. 2017) comme chez les rotifères bdelloïdes (5 à 10% des gènes) (Eyres et al., 2015). Le mécanisme de libération des extrémités des bdelloïdes semble différent de l'hypothèse émise pour le tardigrade *H. exemplaris*, qui pourrait potentiellement protéger les extrémités d'ADN en amont pour ne pas avoir à les "nettoyer" par la suite (Kumagai, 2022).

ii. Des gènes de réparation en copies multiples et sous-fonctionnalisés

Enfin, les rotifères présentent de multiples copies des gènes du c-NHEJ (Ku70, Ku80, DNAPKcs, Artemis, XRCC4, APLF, et Pol λ) ou de LigK. Ces multiples copies sont parfois très divergentes en termes de séquence primaire, et diffèrent aussi dans leur structure secondaire ou tertiaire. D'autres différences sont observables en termes de modifications post-traductionnelles ou de niveau d'expression en réponse à la dessiccation. En effet, de nombreux gènes du c-NHEJ (7 sur les 10 examinés) ont des ohnologues et la majorité ont des profils d'expression différents en réponse à la dessiccation (Hecox-Lea et al. 2018).

Curieusement, à quelques exceptions près, les gènes du NHEJ ne sont pas présents en multiples copies chez les autres eucaryotes, suggérant que les autres espèces ne sont pas capables de maintenir la duplication de ces gènes. En effet, lorsque que deux gènes dupliqués atteignent un certain niveau de divergence par accumulation de mutation, ils finissent par ne plus être orthologues (Walsh, 2003 ; Hecox-Lea and Mark Welch, 2018). Ainsi, chez les bdelloïdes, le maintien de la duplication malgré une divergence fonctionnelle suggère que ces ohnologues couvrent des fonctions multiples et différentes dans la réparation de l'ADN. Maintenir plusieurs fonctions est intuitivement plus simple en passant par différentes copies plutôt que par une seule. La polyploidisation aurait alors pu favoriser

l'émergence de sous-fonctionnalisations ou de néofonctionnalisations parmi les ohnologues (Hecox-Lea and Mark Welch, 2018).

Chez les tardigrades, les cas de polyploidisation n'ont pas encore été étudiés, et il n'a pas été pour le moment été rapporté de duplication systématique du génome avec la présence d'ohnologues, ni d'une sous-fonctionnalisation de certains gènes.

En outre, il a été montré chez les bdelloïdes *Adineta vaga* et *Philodina roseola*, qu'on ne retrouve pas le variant H2AX, normalement phosphorylé en réponse aux CDB. Il n'existe pas d'autres exemples décrits chez les eucaryotes d'absence de l'histone H2AX. Par ailleurs la famille d'histones H2A que possèdent les bdelloïdes montre des divergences inhabituelles au niveau de leur région C-terminale rapport à ce qui retrouvé chez les autres eucaryotes. Ces variations pourraient s'expliquer par une évolution de ces familles d'histone sous la pression des stress génotoxiques générés par la dessiccation chronique à laquelle ils sont confrontés dans leur environnement (Van Doninck et al., 2009).

iii. La conversion génique, un moyen d'échapper à l'accumulation de mutations délétères

L'hypothèse du Muller's ratchet, prédit que la parthénogenèse aboutit sur l'accumulation de mutations délétères dans le génome à cause de l'absence de recombinaison qui permet de dissocier les mutations délétères des mutations bénéfiques. L'accumulation trop importante de mutations délétères chez les espèces parthénogénétiques pourrait mener à long terme à leur extinction (Muller, 1964). Les bdelloïdes affichent un haut taux de conversion génique, ce qui pourrait permettre de remplacer des mutations délétères. Ce phénomène pourrait alors ralentir la dégénérescence moléculaire du génome par le Muller's ratchet (Flot et al., 2013). Toutefois, de nombreux gènes de la RH manquent chez *A. vaga* (Rad52, BRCA2, les hélicases BLM), alors que ces enzymes contribuent à la conversion génique (Kikuchi et al., 2009; LaRocque and Jasin, 2010). Leur absence pourrait alors avoir un effet modérateur sur le taux de conversion génique de cette espèce. En empêchant qu'il y en ait trop, elles pourraient éventuellement permettre d'avoir un équilibre entre limitation de l'accumulation

de mutations par homogénéisation du génome et l'acquisition de nouvelles fonctions protéiques (Hecox-Lea and Mark Welch, 2018)

2. Un insecte résistant à la dessiccation et aux rayonnements ionisants, *Polypedilum vanderplanki*

Polypedilum vanderplanki est une mouche aquatique appartenant à la famille des Chironomidae qui vit dans les régions semi-arides d'Afrique. Pendant son stade larvaire, cet insecte montre une tolérance à la dessiccation presque complète la vie dans l'heure suivant sa réhydratation (Watanabe et al., 2002). Comme chez certains tardigrades, il a été rapporté que cette espèce accumule du tréhalose et des protéines LEA pendant la dessiccation pour protéger la structure cellulaire (Kikawada et al., 2006; Nakahara et al., 2008), ainsi qu'une augmentation de l'expression de protéines chaperonnes pour protéger les protéines de la dénaturation (Gusev et al., 2011). Les larves à l'état anhydrobiotique montrent une plus forte tolérance aux rayonnements ionisants que les larves hydratées (Watanabe et al., 2006a, 2006b, 2007). De manière intéressante, les larves en cours de réhydratation montrent aussi une tolérance à ces rayonnements (Watanabe et al., 2006a; Gusev et al., 2010).

Bien qu'ils possèdent des agents bio-protecteurs comme le tréhalose ou les LEA pour maintenir leur intégrité cellulaire et limiter les dégâts inhérents à la dessiccation, ce n'est pas suffisant pour expliquer la tolérance de ces animaux aux stress génotoxiques générés par la dessiccation. En effet, malgré la présence de ces agents bio protecteurs, une fragmentation de l'ADN est observée en réponse à la dessiccation (Gusev et al., 2010). Par ailleurs, une fragmentation de l'ADN comparable est observée après irradiation avec des rayonnements ionisants à haut TEL (70Gy). En réponse à ces conditions *P. vanderplanki* montre une surexpression d'enzymes de réparation comme Rad23 et Rad51. Rad23 est impliquée dans la reconnaissance et la réparation par excision (ER) ou dans la dégradation protéosomale des protéines mal conformées. Rad51 est impliqué dans la recombinaison homologue. Par ailleurs, les larves montrent en réponse à la dessiccation ou aux radiations ionisantes une forte surexpression d'enzymes antioxydantes comme la SOD et la glutathione peroxydase.

Pour résumer, la dessiccation et l'irradiation activent chez *P. vanderplanki* une réponse physiologique à ce que l'on observe chez certains tardigrades. Cela se reflète par la surexpression de protéines chaperonnes, de protéines de réparation (Rad23, 51) et d'enzymes antioxydantes. Toutefois la tolérance des tardigrades aux stress génotoxiques est bien plus grande que celle de *P. vanderplanki*. En effet *P. vanderplanki* tolère une centaine de Gy de rayonnements ionisants quand les tardigrades tolèrent jusqu'à plusieurs milliers de Gy.

IV. Problématique et objectifs du travail de thèse

J'ai présenté durant cette introduction les connaissances générales que nous avons sur les tardigrades. J'ai également dressé un état des connaissances actuelles sur leur tolérance à la dessiccation et aux stress génotoxiques, ainsi que les mécanismes qui pourraient expliquer cette tolérance. Bien qu'il existe un ensemble d'études qui décrivent leur radiotolérance, on constate que les mécanismes ont été essentiellement abordés pour la résistance à la dessiccation.

Avant le début de ce travail, des études similaires avaient été réalisées pour caractériser la réponse transcriptomique à la dessiccation (Yoshida et al., 2017b), et une étude s'était intéressée à la mesure de l'expression de gènes précis comme l'expression de la photolyase A en réponse aux UVC chez *R. varieornatus* (Horikawa et al. 2013). Néanmoins il n'y avait aucune étude qui caractérisait de manière globale la réponse spécifique aux rayonnements ionisants chez les tardigrades. La découverte de la protéine de protection de l'ADN unique aux tardigrades Dsup, ayant suscité un intérêt supplémentaire quant à la possibilité que les tardigrades aient développé leurs propres mécanismes uniques et originaux de résistances aux dommages à l'ADN, il semblait important de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. C'est dans ce contexte que j'ai débuté ce travail de recherche. Néanmoins, au cours de ma thèse, de nouvelles données ont été publiées. En effet, l'équipe de Kazuharu Arakawa a caractérisé la réponse transcriptomique croisée de *R. varieornatus* aux UVC et à la dessiccation (Yoshida et al., 2022) et a publié des données brutes de transcriptomique de *R. varieornatus* en réponse aux rayonnements γ (Yoshida et al. 2021). Également, une analyse comparative entre plusieurs génomes et transcriptomes de tardigrades a permis de faire un bilan partiel des gènes de réparation présents chez les tardigrades (Kamilari et al., 2019). Malgré ces quelques études supplémentaires, les mécanismes moléculaires impliqués dans la tolérance aux stress génotoxiques restent encore largement inexplorés justifiant l'intérêt de ce travail de recherche sur la réponse au dommage de l'ADN des tardigrades.

L'objectif de mon doctorat était ainsi d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de protection et de réparation de l'ADN qui expliquent l'extraordinaire

résistance des tardigrades aux dommages à l'ADN, avec une attention particulière portée sur leur réponse moléculaire aux radiations ionisantes et à la bléomycine, un radiomimétique. De nombreux gènes présents chez les tardigrades dont des données génomiques et transcriptomiques sont disponibles n'ont pas de fonctions connues. Ainsi, à l'instar de Dsup ou des TDP, des protéines possédant de nouvelles fonctions pourraient permettre d'expliquer la forte tolérance de ces animaux aux irradiations. La question se pose notamment quant à la part entre protection du génome et efficacité de la réparation de l'ADN chez les tardigrades. Plus particulièrement, ces animaux atténuent-ils les dommages dans leur ADN en réponse aux stress génotoxiques ou bien subissent-ils les dommages et y survivent-ils jusqu'à les avoir réparés grâce à des mécanismes de réparation de l'ADN efficace ?

Pour répondre à ces questions j'ai travaillé pendant ma thèse sur trois espèces de tardigrades : *H. exemplaris*, *A. antarcticus* et *P. fairbanksi*, toutes trois appartenant à l'ordre Parachela des eutardigrades, mais la dernière ayant divergé des 2 premières il y a plus de 200 M d'années (superfamille des Hypsibioidae vs Macrobiotoidae). Ces 3 espèces, outre le fait qu'elles soient cultivables en laboratoire, font toutes parties du même ordre, qui compte de nombreuses espèces radiotolérantes. Toutefois, elles sont assez éloignées entre elles pour étudier pertinemment une réponse biologique commune aux rayonnements ionisants. Nous avons cherché dans un premier temps à identifier la cinétique de réparation de l'ADN chez *H. exemplaris* après exposition aux rayonnements γ et à mesurer les réponses transcriptomique et protéomique globales après exposition à des stress génotoxiques qui génèrent des cassures simples et double-brin dans l'ADN. Après avoir réussi à mettre en culture suffisamment de tardigrades des espèces *A. antarcticus* et *P. fairbanksi*, nous avons cherché à identifier des gènes candidats de résistance aux cassures d'ADN conservés chez ces trois espèces. Enfin, la caractérisation de la fonction des gènes candidats, a été menée, notamment par des expériences de gain de fonction en expression hétérologue transitoire en cellules humaines.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article du deuxième chapitre de ce manuscrit.

En parallèle de ces travaux j'ai entrepris de mieux caractériser les propriétés de résistance de l'espèce *A. antarcticus*, connue pour sa résistance élevée aux rayonnements UV (Giovaninni et al. 2018). J'ai évalué dans un premier temps la tolérance de *A. antarcticus* aux rayonnements ionisants. Puis nous avons séquencé, assemblé et annoté son génome pour avoir une vision plus globale des gènes présents chez *A. antarcticus*, et permettre d'examiner s'ils étaient conservés chez d'autres espèces de tardigrades. De manière plus générale, le séquençage de nouveaux génomes permettra plus tard de réaliser une analyse comparative globale des gènes connus comme impliqués dans la protection, la réparation des dommages à l'ADN ou la tolérance à la dessiccation.

Enfin j'ai entrepris l'identification de Dsup dans cette espèce et ai trouvé un orthologue potentiel de RvDsup précédemment décrit. J'ai commencé à caractériser fonctionnellement cet orthologue, en évaluant son impact sur les dommages induits par la bléomycine en cellules humaines.

Ces résultats complémentaires sont présentés à la suite de l'article dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

Deuxième chapitre : Résultats

- I. Article : Novel tardigrade unique gene improves resistance to ionizing radiation in human cells

Novel tardigrade unique gene improves resistance to ionizing radiation in human cells

Anoud M.^{1*}, Delagoutte E.^{1*}, Helleu Q.^{1*}, Brion A.¹, Duvernois-Berthet E.², As M.¹, Marques X.^{1,3}, Lamribet K.¹, Senamaud C.⁴, Jourdren L.⁴, Adrait A.⁵, Heinrich S.⁶, Toutirais G.⁷, Hamlaoui S.⁸, Groppero G.⁹, Ponger L.¹, Gèze M.³, Blugeon C.⁴, Coute Y.⁵, Guidetti R.¹⁰, Giovannangeli C.¹, De Cian A.^{1@}, Concordet J-P.^{1@}

¹ *Department AVIV, MNHN, CNRS UMR7196, INSERM U1154, Paris, France*

² *Department AVIV, MNHN, CNRS UMR7221, Paris, France*

³ *CeMIM, MNHN, CNRS UMR7245, Paris, France*

⁴ *Plateforme Génomique, iBENS, ENS Paris, Paris, France*

⁵ *EDYP, CEA Grenoble, France.*

⁶ *Plateforme RADEXP, Institut Curie, Orsay, France*

⁷ *Plateforme technique de Microscopie Electronique, MNHN, Paris, France*

⁸ *Department AVIV MNHN, UMR7245, Paris, France*

⁹ *MMBM, Institut Curie, CNRS UMR168, Paris, France*

¹⁰ *Department of Zoology, University of Modena and Emiliano Reggiani, Italy*

** co-first authors*

** co-corresponding authors*

ABSTRACT

Recent studies have shown that tardigrades have unique proteins that are involved in the remarkable ability of these small animals to withstand desiccation and ionizing radiation (IR). For resistance to IR, only one tardigrade specific protein has been identified so far: DNA damage suppressor (Dsup), found in *R. varieornatus* and *H. exemplaris*. Rv-Dsup protects from DNA damage by X-rays in human cells, suggesting that DNA protection is important for resistance to IR. Here, we chose to investigate the role of DNA repair and search for novel tardigrade unique genes involved in resistance to IR.

Our results show that in *H. exemplaris* single strand breaks are induced by IR at rates equivalent to those reported in human cells, suggesting that DNA protection plays a minor role in radioresistance in this species. However, we observed recovery of DNA integrity 72h after 1000 Gy γ -rays, demonstrating efficient DNA repair. Next, we examined gene expression in response to ionizing radiation in three different tardigrade species, including one species missing Dsup. In all three species, we observed overexpression of genes needed for repair of DNA damages induced by IR including RNF146, a ubiquitin ligase previously reported to be essential for resistance to IR in human cells, suggesting highly conserved mechanisms of DNA repair *per se* take place. In addition, in all three tardigrade species, among the most overexpressed genes, we found a novel tardigrade specific gene: Tardigrade DNA Damage Response gene 1 (TDR1). *In vitro*, TDR1 protein interacted with DNA and formed condensates suggesting an ability to compact DNA. Importantly, when expressed in human cells, TDR1 improved resistance to Bleomycin, a radiomimetic drug. We propose that TDR1 is a novel tardigrade-unique gene needed for resistance to IR, possibly by helping to preserve chromosome organization until DNA repair is achieved.

INTRODUCTION

Tardigrades are small aquatic animals living in marine and freshwater environments that are also commonly found in lichen, mosses and other terrestrial habitats. Tardigrades in such habitats are exposed to desiccation which they can withstand by contracting into a dehydrated, a-metabolic tun. Preservation of cell and tissue integrity during dehydration involves several families of proteins such as CAHS, MAHS and SAHS proteins that are unique to tardigrades, (Hesgrove and Boothby 2020; Arakawa 2022) .

Similar to many organisms resistant to desiccation, tardigrades are also resistant to ionizing radiation (IR) (Jönsson 2019). For example, the model species *H. exemplaris*, whose genome has been sequenced (Yoshida et al. 2017), can survive γ -ray doses superior to 4000 Gy (Beltrán-Pardo et al. 2015). In contrast to the numerous proteins involved in resistance to desiccation, only one protein unique to tardigrades, called Dsup for DNA damage suppressor, has been involved in resistance to IR so far (Hashimoto et al. 2016). Dsup is thought to contribute to resistance to IR by protecting the genome from DNA damage. It interacts with DNA and when expressed in human cells, DNA damage induced by X-rays is reduced and cell survival increased (Hashimoto et al. 2016). In addition, *in vitro*, Dsup can reduce DNA damage induced by hydroxyl radicals (Chavez et al. 2019).

DNA protection, possibly through DNA condensation (Levin-Zaidman et al. 2003), was also previously suggested to play a role in the exceptional radioresistance of *D. radiodurans* bacteria. Nevertheless, high levels of DNA damage are still induced in *D. radiodurans* and studies of DNA repair and gene expression in response to IR have unravelled original proteins and molecular mechanisms involved (Zahradka et al. 2006; Timmins and Moe 2016). In order to improve our understanding of resistance to IR in tardigrades, we therefore sought to investigate the potential role of DNA repair and to identify novel proteins unique to tardigrades involved in resistance to IR.

For this purpose, we first examined the kinetics of DNA damage and repair after IR in *H. exemplaris* tardigrades. Next, in order to identify novel genes involved in resistance to IR, we analyzed gene expression in response to IR in three tardigrade species. A tardigrade unique gene, which we named Tardigrade DNA damage response gene 1, (TDR1), was strongly upregulated in all three species tested in response to IR. Differential analysis of the proteome in *H. exemplaris* showed a good correlation with changes of the transcriptome, including for

TDR1, whose activation was further established by western blot. Recombinant TDR1 interacted with DNA *in vitro* and at high concentrations, it formed condensates with plasmid DNA. Importantly, when expressed in human cells, TDR1 reduced the number of phospho-H2AX foci induced by Bleomycin, a DNA damaging drug used as a radiomimetic. TDR1 is therefore a novel tardigrade unique DNA binding protein that could play an important role in DNA repair after IR in tardigrades and have original biotechnological applications.

RESULTS

Single and double strand breaks are induced and repaired after exposure to IR

Both directly, by attacking DNA, or indirectly, by generating reactive oxygen species from water, IR induces a variety of DNA damages, including single and double strand breaks and chemical changes of bases (Téoule 1987). In order to investigate the role of DNA protection and repair in resistance of tardigrades to IR, we assessed the physical integrity of genomic DNA at several time points after irradiation. *H. exemplaris* tardigrades were exposed to either 100 or 1000 Gy of ^{137}Cs γ -rays, doses known to be well tolerated by *H. exemplaris* (Beltrán-Pardo et al. 2015). Single strand breaks (SSBs) were evaluated by denaturing gel electrophoresis of DNA extracted at 30 min, 4h30, 8h, 24h and 72 h after irradiation. DNA from control, non-irradiated tardigrades could be visualized as a predominant band running above the 20 kb marker with a smear. The smear, likely due to the harsh extraction conditions needed for tardigrade lysis, extended down between 20 and 10 kb markers where a discrete band, of unknown origin, could be detected (Figure 1a). At 30 min after 1000 Gy irradiation, the high molecular weight band was drastically reduced and DNA between 10 and 20 kb was strongly increased. In addition, the discrete band could no longer be detected. IR therefore induced high rates of SSBs and the size of DNA fragments reinforcing the smear and of the discrete band that disappeared are consistent with a rate of 1 SSB every 10 to 20 kb. Between 4h30 and 24h, the DNA migration profile was progressively restored and between 24h and 72h, it was identical to controls. Similar results were observed with the 100 Gy dose. However, compared to 1000Gy, changes were milder at all times post-irradiation and the discrete 10-20 kb band could always be detected. Taken together, these results indicate that single-strand breaks are inflicted by IR in a dose-dependent manner, roughly estimated at 1 SSB every 10 to 20 kb for 1000 Gy, and progressively repaired within the next 24 to 72h (Figure 1a).

Importantly, the rate of SSBs inflicted by ^{137}Cs γ -rays did not appear significantly different from that inflicted in human cells, which was reported to be of 0,17 SSB/Gy/Mb .

In order to detect DSBs, samples from Figure 1a were also run in native agarose gels but irradiated samples were indistinguishable from non-irradiated controls (supp Fig 1a), likely due to insufficient DSBs at the doses tested. To have a more sensitive method for detecting DSBs, we therefore raised an antibody against phosphorylated H2AX (supp Fig 2). In eukaryotes, from yeast to humans, phosphorylation of H2AX is a universal response to DSBs and a prerequisite step towards DNA repair (Fernandez-Capetillo et al. 2004). We next analyzed phospho-H2AX in *H. exemplaris* protein extracts prepared at different time points after irradiation. For both 100 and 1000 Gy doses, phospho-H2AX was detected at 30 min post-irradiation, reached its highest levels at 4h30 and 8h time points and later decreased (Figure 1b). Similar kinetics were also observed when using an accelerated electron beam which allowed to deliver identical doses in much shorter times and made it possible to better appreciate the early peak of phospho-H2AX (supp Fig 1b).

Altogether, the experiments from Figure 1 suggest that SSBs are inflicted at equivalent rates in *H. exemplaris* tardigrades than in human cells and that consequently, the exceptional resistance of tardigrades to IR must involve DNA repair. In addition, by examining single- and double- strand breaks after IR, we provided direct evidence of repair of both types of DNA damages.

Tardigrades of three different species overexpress canonical DNA repair genes in response to IR as well as unique genes restricted to tardigrades

Previous studies had indicated that after irradiation with IR, expression of Rad51, the canonical recombinase of homologous recombination, is induced in *M. inceptum* (Beltrán-Pardo et al. 2013) and that XRCC5 and XRCC6, the DNA binding proteins bridging DNA ends in Non-Homologous End Joining, are induced in *R. varieornatus* (Yoshida et al. 2021). To examine global gene expression patterns associated with tardigrade response to DNA damage from IR, RNA sequenced 4h post-irradiation. In addition to the *H. exemplaris* model species, one additional species of the *Hypsibiidae* family was selected, *Acutuncus antarcticus*, which was previously shown to be resistant to high doses of UV, possibly related to high UVB exposure in its natural Antarctic environment (Giovannini et al. 2018), and *Paramacrotis fairbanksi* (Guidetti et al. 2019), which was reared from a suburban garden moss and was of interest as

a representative of *Macrobiotidae*, a major tardigrade superfamily considered to have diverged from *Hypsibioidea* more than 250 My ago (Regier et al. 2005) and in which the first demonstration of resistance to γ -irradiation resistance was carried out (LD50_{24h} = 5700Gy of *Macrobiotus areolatus* species) (May 1964).

In all three species, numerous genes were significantly overexpressed in response to IR and fold stimulation of RNA levels was often remarkably high (Figure 2, Table 1). For example, in *H. exemplaris*, 421 genes were overexpressed more than 4-fold (with an adjusted p-value < 0,05), including 120 more than 16-fold (supp Table 1). In particular, both genes with and without homologs in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans were overexpressed. Strikingly, many overexpressed genes were common to all three species (Figure 2, Table 1, supp Table 1-3) suggesting (i) that some of these genes may be essential for resistance of tardigrades to IR and (ii) that a conserved signaling and transcriptional program is involved in their upregulation in response to IR.

Key genes of DNA repair pathways already known to be essential for repair of DNA damages inflicted by IR were strongly overexpressed in all three species. For example, genes for XRCC5 and XRCC6, forming the Ku complex needed to stabilize DNA ends during DSB repair by Non-Homologous End Joining (Doherty and Jackson 2001), were among the most strongly stimulated genes in all three species (Figure 3a). Similarly, the gene for POLQ, the key distinctive polymerase acting at multiple steps in Micro-homology Mediated End Joining (Mateos-Gomez et al. 2015); genes for RAD51 and MACROH2A1 in Homologous recombination (Khurana et al. 2014; Baumann and West 1998); for XRCC1 and LIG1 in Base Excision repair (Whitehouse et al. 2001; Krokan and Bjørås 2013) as well as for PARP2 and PARP3, catalyzing parylation of many DNA repair proteins (Pascal 2018), were also among the most significantly and strongly overexpressed genes in all three species (Figure 3a). More generally, among all significantly stimulated genes, an impressive number genes of DSB, SSB and Base Excision repair were overexpressed after IR in all three species (supp Fig 3).

Unexpectedly, strong upregulation of RNF146 was observed. RNF146 is a RING finger ubiquitin ligase known to interact with parylated proteins and trigger their degradation by the ubiquitin proteasome system. Although best studied for its role in Wnt signaling (Zhang et al. 2011), RNF146 has also been reported to be essential for tolerance to IR in human cells (Kang et al. 2011). Although only reported once in human cells before, activity of RNF146 could therefore also be essential to the remarkable resistance of tardigrades to IR.

Interestingly, among genes overexpressed in all three species with no homologs in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans, there were 108 genes that could therefore be specific to tardigrade DNA damage response to IR (Table 1). The 108 genes included many previously uncharacterized genes but also included genes already known to be unique to tardigrades such as AMNP (Yoshida et al. 2022) and CAHS12 (Arakawa 2022). AMNP is from a recently discovered family of tardigrade unique Mn Peroxidases reported to be overexpressed in response to desiccation and UVC in *R. varieornatus* and illustrating the concept of cross-tolerance, i.e. that pathways of resistance to desiccation benefit the response to other types of stresses. AMNP was found to protect from oxidative stress when expressed in human cells (Yoshida et al. 2022) and could also do so after IR. In order to prioritize among previously uncharacterized genes of interest, we also determined the transcriptomic response to Bleomycin, a well-known genotoxic drug (Bolzán and Bianchi 2018), in *H. exemplaris* and *A. acutuncus*. 25 genes with no homologs in the model species were overexpressed in all species and all conditions (supp Table 6) and the top ranking in most cases was the same gene. We named it TDR1 (for Tardigrade DNA damage Response 1). Because TDR1 expression was strongly upregulated in response to IR and Bleomycin, we considered it was a promising candidate to investigate further for a potential role in DNA repair.

Analysis of TDR1 protein expression and global proteome response to IR in *H. exemplaris*

We next sought to ascertain whether stimulation of gene expression at the RNA level led to increased protein levels and whether TDR1 protein was indeed expressed. For this purpose, we first generated specific antibodies to *H. exemplaris* TDR1, XRCC5, XRCC6 and Dsup proteins. Protein extracts from *H. exemplaris* treated with Bleomycin for 4 days or 1000Gy of γ -rays at 4hr and 24hr post-irradiation were compared to untreated controls. As for phospho-H2AX, TDR1 was only detected after induction of DNA damage (Figure 3a, supp Figure 4). XRCC5 and XRCC6 protein levels were also stimulated by both Bleomycin and IR treatments, albeit fold stimulation was much lower than for RNA (Figure 3a). In addition, we also checked expression of Dsup, which was constant at the RNA level (supp Table 1), and found that it also remained stable at the protein level after induction of DNA damage. Furthermore, to check that stimulation at the protein level was due to new protein synthesis, tardigrades were incubated with cycloheximide prior to irradiation. As expected, no stimulation of protein levels could be detected after irradiation in extracts from animals treated with cycloheximide (supp Figure 5).

In particular, TDR1 protein could not be detected when animals were treated with cycloheximide, further showing that TDR1 is strongly upregulated in response to IR.

To further extend the analysis of the response to IR at the protein level, we performed an unbiased proteome analysis by mass spectrometry and compared proteomes from *H. exemplaris* at 4h post-irradiation, 24h post-irradiation and after Bleomycin treatment with untreated controls. More than 5600 proteins could be detected in each condition and 168 had a $\text{Log}_2(\text{FC}) > 0.3$ with a $p\text{-value} < 0.01$ (Figure 3b, Table 2 and supp Table 7-10). We observed a good correlation between fold stimulation at RNA and protein levels (Figure 3c). In keeping with observations on stimulation of XRCC5 and XRCC6 by western blot, however, we noted that the fold stimulation of protein levels was always much weaker than for RNA (2 to 100 times weaker). For all strongly overexpressed genes discussed above, we confirmed significantly increased protein levels in response to IR (Figure 3b). Importantly, despite the small size of the predicted TDR1 protein, abundant TDR1-related peptides were recovered in irradiated samples, thus providing direct evidence of TDR1 expression in response to IR.

He-TDR1 interacts directly with DNA

In addition to the three species studied, BLAST searches allowed to identify potential TDR1 orthologs in several other *Macrobioidea* (Figure 4a). The predicted sequence of TDR1 proteins is between 144 and 291 amino acids long. They differ at the N-terminal end, which can be of different lengths, and are most similar in the C-terminal end which is predicted to have 4 separate alpha-helices (Figure 4b). Interestingly, TDR1 sequences contain a relatively high proportion of basic amino acid residues (20,5% of K or R amino acids), including at conserved positions of the 4 predicted alpha helices. We therefore wondered if TDR1 might interact directly with DNA. To test this possibility, we purified from *E. Coli* recombinant HeTDR1 and HeTDR1-GFP, a fusion of He-TDR1 and eGFP, (supp Fig 6). Interestingly, elution of He-TDR1 on gel filtration coincided with an apparent size two- to three-fold higher than predicted, suggesting the constitutive formation of TDR1 homo-dimers or -trimers (supp Fig 6c). Next, we tested interaction with DNA by gel shift assays. As shown in Figure 4, fluorescently labelled single-stranded or double-stranded oligonucleotides were incubated with increasing concentrations of He-TDR1 and analyzed by gel electrophoresis. When higher than 0.2 μM He-TDR1 was added, the fluorescently labelled oligonucleotides could no longer be detected (Figure 4c). Identical results were obtained with He-TDR1-GFP (Figure 4d). This

strongly suggests non-sequence specific interaction of *He*-TDR1 with DNA. Given the amount of DNA used, roughly one *He*-TDR1 protein is bound every 3 bp of DNA, similar to the binding reported for other non-sequence specific DNA binding proteins such as Rad51 (Zaitseva, Zaitsev, and Kowalczykowski 1999). Possible explanations for the absence of DNA signal in the presence of excess HeTDR1 include quenching of the fluorophore or formation of *He*-TDR1/DNA aggregates that could not enter into the gel. Interaction of *He*-TDR1-GFP with plasmid DNA was also investigated. At 10 μ M *He*-TDR1-GFP, samples were examined by fluorescence microscopy and fluorescent spots could clearly be visualized in these conditions (Figure 4e), suggesting that high concentrations of *He*-TDR1-GFP lead to the formation of large protein-DNA condensates (of approximately 5 μ m) that are unable to enter into the gels. Taken together, these experiments clearly document interaction of *He*-TDR1 with DNA and an unexpected ability of *He*-TDR1 to compact DNA into condensates.

He-TDR1 is localized in tardigrade nuclei

In order to test the subcellular localization of *He*-TDR1, we generated a tardigrade expression plasmid with *He*-TRD1-mNeonGreen cDNA downstream of *He*-*Actin* promoter sequences and transferred it into live tardigrades using a recently reported protocol ((S. Tanaka, Aoki, and Arakawa 2022), summarized in Fig5a-b). *He*-TDR1-mNeonGreen was predominantly expressed in muscle cells, likely due to high muscle-specific activity of the actin promoter, and predominantly localized to nuclei, as examined by confocal microscopy both before and after irradiation by γ -rays (Figure 5c-d). Importantly, *He*-TDR1 co-localized with Hoechst staining (Figure 5d), consistent with *He*-TDR1 being able to interact with DNA *in vivo*.

TDR1 orthologs diminish phospho-H2AX foci in human U2OS cells treated with Bleomycin

We next wondered if TDR1 expression could impact the number of phospho-H2AX foci upon treatment of human U2OS cells with Bleomycin. Upon induction of double-strand breaks, H2AX is phosphorylated along extended DNA regions near the break and phospho-H2AX foci can be easily detected by immunolabeling, thus allowing to indirectly visualize and quantify DSBs in nuclei (Lowndes and Toh 2005). We thus designed plasmids for expression of fusion proteins of several TDR1 proteins with GFP, transfected them into human U2OS cells, and 48h later, treated the cells with 10 μ g/ml Bleomycin to generate DSBs. This allowed to visualize the subcellular localization of the TDR1 proteins by immunofluorescence and to quantify

phospho-H2AX foci in response to Bleomycin by immunolabeling with anti-human phospho-H2AX antibody. As controls, we transfected plasmids expressing either GFP or *RvDsup*-GFP into U2OS cells. As shown in Figure 6a, TDR1-GFP proteins were localized in the nucleus of transfected cells, consistent with the ability of *He*-TDR1 to directly interact with DNA *in vitro* and its nuclear localization after transgenic expression in *H. exemplaris* tardigrades. Many DNA repair proteins co-localize with phospho-H2AX foci or exhibit foci upon induction DSBs but this was not the case for *He*-TDR1-GFP nor for *RvDsup* (Figure 6a). Quantification of phospho-H2AX was done in transfected cells and is shown in Figure 6b. As previously shown (Hashimoto et al. 2016), expression of *RvDsup* reduced the number of phospho-H2AX foci. Importantly, expression of all tardigrade TDR1-GFP fusion proteins tested also significantly reduced the number of phospho-H2AX foci in human cells treated with Bleomycin, consistent with a potential role of TDR1 proteins in tardigrade resistance to IR.

DISCUSSION

DNA protection and repair in resistance of tardigrades to IR

Examining DNA on denaturing agarose gels led us to infer that SSBs were induced every 10 to 20 kb after exposure of *H. exemplaris* tardigrades to 1000 Gy γ -rays. This corresponds to a rate of 0.1 to 0.2 SSB/Gy/Mb which, unexpectedly, is remarkably similar to the rate of 0.17 SSB/Gy/Mb reported for cultured human cells (Mohsin Ali et al. 2004). Our finding may therefore be taken to imply that DNA protection, if any, only plays a minor role in resistance to IR of *H. exemplaris* tardigrades. Mechanistic studies should allow to further address this question. For example, recent progress in tardigrade transgenesis (S. Tanaka, Aoki, and Arakawa 2022) is a promising step towards gene editing and knocking out the *Dsup* gene would be needed to further evaluate the relative importance of DNA protection. Other types of DNA damages might still be mitigated by DNA protection, as was suggested for thymine dimers induced by UVC in dehydrated *R. variernatus* compared to *H. exemplaris* (Horikawa et al. 2013a). Different species may also exhibit differences in the relative importance of *Dsup* and DNA protection processes.

Our semi-quantitative evaluation of SSBs also suggests, given the size of the *H. exemplaris* genome is 104 Mb, that 10-20 000 SSBs are present per cell at 30 min post-irradiation with a

1000 Gy and that these appear to have been repaired by 24h post-irradiation. If we hypothesize that DSBs are also induced at a rate similar to human cells, irradiation with 1000 Gy would simultaneously involve the challenge of 500 DSBs per cell. We detected DSBs indirectly, by western blot with an antibody raised against phosphorylated He-H2AX, and could not estimate absolute DSB levels but clearly showed significant repair over the 72h post-irradiation. Our analysis of DNA damage provides direct evidence for the importance of DNA repair in resistance of tardigrades to IR. In other radioresistant organisms, high levels of DNA damage, comparable to non-radioresistant organisms, were also detected (Gladyshev and Meselson 2008). Altogether, direct evidence for DNA protection in living organisms remains controversial and adaptation of DNA repair therefore appears to be a common requirement for resistance to IR.

Fine regulation of scaffolding proteins interacting with DNA damage to cope with high rates of DNA damage inflicted by IR

By comparing the transcriptional response to IR in three different species, we uncovered a shared upregulation of a wide number of DNA repair genes. Remarkably, highest induction levels, both at RNA and protein levels, were detected for proteins acting early in DNA repair in the different pathways involved (XRCC5/XRCC6/LIG4 in NHEJ, POLQ in MMEJ, XRCC1/LIG1 in BER and SSB, PARP2 and PARP3 in DSB pathways and in BER). A common molecular feature of these early acting proteins is that they either stabilize DNA ends or provide essential scaffolding for subsequent steps of DNA repair. One possibility is therefore that higher levels of such proteins may be essential to maintain DNA ends long enough for more limiting components of DNA repair to cope with exceptionally abundant breaks. PARP proteins act as sensors of DNA damage in DSB repair pathways and BER but also catalyze PARylation of numerous DNA repair proteins. In response to IR, a poorly characterized reader of poly (ADP-ribose) modification, the RNF146 ubiquitin ligase was also strongly upregulated. Interestingly, RNF146 is itself a target for PARylation, which triggers its allosteric activation (DaRosa et al. 2015), and RNF146 was previously shown to target PARylated XRCC5, XRCC6, XRCC1 and PARP2 for degradation by the ubiquitin proteasome system (Kang et al. 2011). It is therefore tempting to speculate that a fine balance of synthesis and targeted degradation of XRCC5, XRCC6, XRCC1 and PARP2, possibly as a requirement for removing initial scaffolding complexes from DNA, is essential for resistance of tardigrades to IR.

Further studies should investigate the molecular mechanisms leading to such marked upregulation of RNA levels of these genes. Functional analysis of promoter sequences in transgenic tardigrades is now possible and could help to identify a conserved set of transcription factors and/or co-regulators common at least to the *Macrobiotodea* and *Hypsibioidea* tardigrades studied here. Such information would provide original insight into the acquisition of resistance to IR and help analyze its relation to the resistance to desiccation. Another outstanding issue, given the high rates of DNA damage that appear to take place, is whether DNA repair is accurate. This is particularly relevant for germ line cells at lower doses compatible with reproduction where mutations will be transmitted to the progeny. Finally, although we chose to focus on DNA damage and repair mechanisms, all components in the cell are impacted by IR. Protection and repair of proteins and lipids have been less investigated but are also essential to radioresistance. We noted that genes for the mitochondrial chaperone BCS1L, which may help repair mitochondria damaged by IR (Pearce et al. 2001), and the sequestosome SQSTM1, whose functions in human cells include targeting aggregates of misfolded proteins for degradation (Ciechanover and Kwon 2017), were among the most overexpressed genes in all three species studied and have also been recently found upregulated in response to desiccation and UVB (Yoshida et al. 2022). Further datamining may therefore pinpoint interesting candidates in repair of damaged proteins or lipids.

A novel tardigrade-unique DNA binding protein involved in resistance to IR

Among the genes overexpressed in response to IR that are common to the three species studied and that don't have any homolog in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans, we identified TDR1 as a promising candidate. The C-terminal portion of TDR1 is conserved in species of *Macrobiotodea* and *Hypsibioidea* superfamilies of tardigrades but absent from other species, including *R. varieornatus*, a third species of the *Hypsibioidea* and *M. inceptum*, the only representative of the *Milnesiidae* for which transcriptomic data is available (supp Figure 7). Compared to Dsup, which has only been found in *Hypsibioidea* and whose *H. exemplaris* and *R. varieornatus* orthologs only have very low sequence homology, TDR1 could therefore be a more ancient gene of tardigrades. It will also be interesting to find out if TDR1 and Dsup are conserved in species that have lost the ability to resist desiccation (and possibly IR) and further establish their phylogeny. More generally, evolution of tardigrade-unique gene sequences is highly dynamic in the phylum (Horikawa et al. 2013b) and sequencing of

tardigrade genomes will help to get a better picture of these remarkable evolutionary processes.

At the functional level, we found that TDR1 protein interacts with DNA, most likely independently of DNA sequence, and that when expressed in human cells, TDR1 protein can reduce the number of phospho-H2AX foci induced by Bleomycin. TDR1 is strongly overexpressed in response to IR and our results therefore suggest that it favors DNA repair. Proteins directly involved in DNA repair, however, usually accumulate at sites of DNA damage (Rothkamm et al. 2015), which did not appear to be the case for TDR1 overexpressed in human cells or in tardigrades. Given that TDR1 can form multimers and condensates with DNA *in vitro*, we speculate that it may favor DNA repair by regulating chromosomal organization. Intriguingly, the DNA binding activities of TDR1 are reminiscent of DdrC from *R. radiodurans*. DdrC is a small DNA binding protein which is among the most strongly overexpressed proteins after irradiation of *R. radiodurans* with γ -rays (M. Tanaka et al. 2004) and DdrC also forms dimers and condensates with DNA *in vitro* (Banneville et al. 2022; Bouthier de la Tour et al. 2017). Further investigations of Dsup and TDR1 should unravel an unexpected diversity of molecular activities in maintenance of genome integrity and may shed light on potential parallels between radioresistance in tardigrades and bacteria.

MATERIAL AND METHODS

Tardigrade culture

Hypsibius exemplaris (souche Z151, Sciento, UK) and *Acutuncus antarcticus* (Giovannini et al. 2018) were cultivated in mineral water (Volvic, France) at 16°C with a 14h day and 10h night cycle and fed with *Chlorella vulgaris* microalgae (kindly provided by Sahima Hamlaoui, Algothèque MNHN, France). *Paramacrobiotus fairbanksi* was isolated from a suburban garden moss by A.D.C. and cultivated in the same conditions adding rotifers isolated from the same moss sample (grown separately in mineral water and fed with *Chlorella*) of as supplementary food for adults. Identification as *P. fairbanksi* was achieved by morphological and mitochondrial DNA analysis (supp Figure 8).

γ-ray and Bleomycin treatments of tardigrades

Tardigrades were exposed to ionizing radiation from a ¹³⁷Cs γ-ray source (GSR-D1 irradiator, RPS Services Limited) at a dose rate of 12,74 or 16Gy/min. For investigation of early first time point just after ionizing radiation, an electronic beam (KINETRON, GCR-MeV) with 4.5MeV energy and maximum dose rate of 4.103 Gy/sec was also used (Lansonneur et al. 2019). Prior to irradiation, tardigrades were separated from chlorella by filtering with a 70 μm mesh and cultivated without *Chlorella* for 3 to 7 days. For Bleomycin treatment, after separating tardigrades from *Chlorella* by filtration, Bleomycin sulfate (#B5507 SIGMA) was added to the water for 4 or 5 days at a final concentration of 100 μM.

Genomic DNA extraction and analysis

Tardigrade genomic DNAs (gDNAs) were extracted using the Monarch HMW DNA extraction kit for Tissue from NEB with the following modifications. Lysis buffer was supplemented with proteinase K before proceeding to lysis. Pellets of 8000-12000 tardigrades were resuspended in 35 μL of lysis buffer and grinded on ice for 1 minute. This step was repeating twice leading to a final volume of ≈ 125 μL. After grinding, lysis proceeded in three steps: 1) incubation of 15 min at 56°C under gentle agitation (300 rpm), step 2) incubation of 30 min at 56°C and step 3) incubation of 10 min 56°C after addition of RNase A. Proteinase K and RNase A were added at the concentration recommended by NEB. Proteins were next separated from the gDNA by adding 40 μL of protein separation solution. Samples were next centrifuged (20 minutes,

16000 g, 20°C). gDNA was precipitated with 2 beads and next eluted from the beads with 100 µL of elution buffer. Extracted gDNAs were analysed by electrophoresis on native (0.9% agarose/1X TAE) or denaturing (0.9% agarose/ CHECK 50 mM NaOH/ 1 mM EDTA) gels. Electrophoresis conditions were: 2h30/ 60 V/ 20°C for native gels, and 18 V/ 15 hours/ 20°C for denaturing gel. Native gels were stained with ethidium bromide and denaturing gels with SyBRGreen I.

Production of antibodies against *H. exemplaris* proteins

Antibodies were raised against *H. exemplaris* proteins in rabbits by injecting selected peptide sequences by Covalab (Bron, France). For *He-Ku80* (XRCC5), *He-Ku70* (XRCC6 C-term) *He-Dsup*, *He-TDR1* two peptides were injected in two rabbits and serums tested by Western blot on *H. exemplaris* extracts from animals treated with 100µM Bleomycin during 4 days. Serum showing the best response at day 88 after injections was purified on Sepharose beads coupled to immunogenic peptides. Peptides used were the following., *He-TDR1*: (BV898_14257 corrected for 2nd Exon) : Peptide 1 (37-52): C-IQDEVLDSSRSGSRNVcoNH₂, Peptide 2 (109-123): C-DKKKQKSLPKIRRDN-coNH₂; *He-Ku80* (XRCC5): Peptide 1 (120-135): C-IQFDEESSKKKRFKR-coNH₂, Peptide 2 (444-457):C-LDGKAKDITYQPNDE-coNH₂; *He-Ku70* (XRCC6 Cterm): Peptide 1 (182-197): C-IRPAQFLYPNEGDIRG-coNH₂, Peptide 2 (365-372): C-YDPEGAHTKKRVYEK-coNH₂; *He-Dsup*: Peptide 1 (63-77): C-KTAEVKEKSKSPAKE-coNH₂, Peptide 2 (166-181): C-KEDASATGTNGDDKKE-coNH₂. Production of antibody to *He-phospho-H2AX* is detailed in supp. Fig. 2.

Western blot analysis

>10 000 tardigrades were irradiated and 1000-2000 tardigrades were collected at different times after irradiation, centrifuged at 8000 rpm in 1,5 mL tubes for 5 min and the pellet frozen at -80°C until analysis. Lysis was carried out by sonication (Bioruptor, Diagenode) at 4°C in 100µL/5000 tardigrades pellet of the following solution 12mM sodium deoxycholate, 12mM N-Laurylsarcosine sodium, 80mM Tris-HCl pH8,5, 400mM NaCl, 1X protease inhibitor (Roche) and 1X PhosSTOP (Roche). 0,5 vol of protein gel loading buffer (LDS 4X, Bio-Rad) was added and the mixture heated at 95°C for 5 min before loading onto TGX Stain-Free AnyKD (Bio-Rad) and migration in 1x Tris-Glycine-SDS buffer at 200V. Semi-dry transfer of proteins was performed with Transblot Turbo (Biorad) onto nitrocellulose membrane and the membrane

was cut half to separately detect proteins > 50 kDa and <50 kDa. Protein detection was done with rabbit primary antibodies diluted 1:1000 or 1:2000 (20-200ng/mL depending on antibody) in TBS-0,1% Tween, 5 % BSA, supplemented with 1:10000 dilution of anti-mouse alpha-Tubulin (Clone B-5-1-2; SIGMA) and secondary antibodies diluted 1:5000 (anti-rabbit Starbright 720 (Biorad) for specific tardigrade proteins and anti-mouse Starbright 520 (Bio-Rad) for alpha-tubulin detection) in TBS-0,1% Tween using Chemidoc MP imager (Bio-Rad).

RNA sequencing

After centrifugation at 8000 rpm in 1,5 mL tubes, RNA was extracted from 15000 -20000 *H. exemplaris*, 1000-1500 *A. antarcticus* and 500-1000 *P. fairbanksi* using Trizol (#15596-026, Invitrogen) and by three freeze-thaw cycles in an ethanol-dry ice bath and mechanical disruption with glass beads and a plastic micro-tube homogenizer at each cycle. Yield was approximately 1µg RNA/ 1000 tardigrades. Integrity of RNAs was checked on an Agilent 2100 Bioanalyzer with the Eukaryote Total RNA Nano kit and only samples with RIN (RNA Integrity Number) >6 were sequenced. For *H. exemplaris* RNA samples, single end (1x75) sequencing (TruSeq Stranded) was done on Illumina NextSeq 500. For *A. acutuncus* and *P. fairbanksi* (whose genomes are not available), paired end (2x150) sequencing (TruSeq Stranded) was performed. In addition to short read RNA sequencing in the different experimental conditions, long read sequencing of a mixture of RNA samples of *A. acutuncus* and *P. fairbanksi* species, respectively, was performed with Minion Oxford Nanopore technology to help improve transcriptome assembly. 1D libraries were prepared according to ONT protocol with 1D PCR Barcoding kit and full length non-directional sequencing was performed (using Clontech-SMART-Seq v4 Ultra Low Input kit). Basecalling was conducted using guppy version v6.4.2 (-min_qscore 7 --flowcell FLO-MIN106 --kit SQK-PBK004 --use_quantile_scaling --trim_adapters --detect_primer --trim_primers).

De novo Transcriptome assembly

Since, no genome assembly was available for *A. antarcticus* and *P. fairbanksi*, we assembled a *de novo* transcriptome using full length cDNA sequences for each species. We used the software RNA-Bloom (v2.0.0) to assemble the long reads, using also a subset of the produced short reads to correct the contigs. Then we used CD-Hit-EST (v4.8.1) to cluster together transcript isoforms from a same gene. We set the divergence to 0.9 for *A. antarcticus* and 0.8

for *P. fairbanksi*, the latter seems to be triploid and the divergence between isoforms was higher.

For *A. antarcticus* and *P.fairbanksi*, we conducted the gene expression analysis using the softwares embedded in the Trinity suite (v2.15.0). We first mapped RNA-seq reads on the transcriptomes using Salmon, then we measured differential gene expression using DESeq2.

As *H.exemplaris* genome was available, gene expression analysis for this species was conducted using Eoulsan workflow version 2.2 (v2.2-0-g4d7359e). First, we mapped RNA-seq reads on the transcriptomes using STAR, then we measured differential gene expression using DESeq2. CHECK Laurent Jourden

The results were plotted using R (v4.2.2) with the ggplot2 and ggrepel packages.

To annotate the transcriptomes, we ran EggNog v2.1.9 on the assemblies using the genome mode. We also annotated all expressed genes through a sequence homology search approach (using blastx) on *Drosophila melanogaster* (GCF_000001215.4), *Caenorhabditis elegans* (GCF_000002985.6) and *Homo sapiens* (GCF_000001405.40) RefSeq proteomes. Gene sequences with no hit in all three RefSeq proteomes were considered as Tardigrade specific and noted "Tardi" in supp Tables and data.

Proteome analysis

For each replicate (n=4 independent biological samples), 18000 tardigrades per conditions (untreated, treated with Bleomycin at 100 μ M for 4 days, Irradiated with 137Cs γ -ray source (GSR-D1 irradiator, RPS Services Limited) at a dose rate of 12,74Gy/min and collected 4h after irradiation or 24h after irradiation), were pelleted by centrifugation in 1,5mL tubes (8000 rpm for 5 min) and split in 2: 13000 tardigrades for differential proteomic analysis and 5000 tardigrades for western blotting experiments. The pellets were frozen at -80°C until all sample were available. All samples were lysed the same day 2 weeks before proteomics analysis in 100 μ L iST-NHS-Lysis buffer (PreOmics GmbH) by sonication (Bioruptor (Diagenode) 15s ON/15s OFF 15 for 15 min), and heating at 95°C for 10min. Soluble fractions were collected by centrifugation at 13000g for 15min at 4°C and frozen at -80°C until analysis. The 16 samples were labelled respectively with TMTpro 16plex kit (Thermo Scientific), pooled, desalted and fractionated on Reverse Phase high pH (Pierce). 8 fractions were analysed in mass spectrometry to increase the proteome coverage. Protein were identified and quantified with MaxQuant software(Cox and Mann 2008). Statistical analysis was carried out with ProStaR

(Wieczorek et al. 2017). Proteins considered as differentially expressed were quantified in 3 replicates over 4 in the 3 conditions tested and have an p-value < 0,01 (test Limma) and a $\text{Log}_2(\text{FoldChange}) < -0.3$ or $\text{log}_2(\text{FoldChange}) > 0,3$.

Production of recombinant He-TDR1 and He-TDR1-GFP

He-TDR1 and He-TDR1-GFP were transformed in *E.coli* Rosetta™ 2(DE3) Singles competent cells (Novagen, MerckMillipore). Protein expression was induced with 1 mM IPTG at $\text{OD}_{600}=0,6-0,7$ in 2xYT medium (containing 50 µg/mL carbenicillin, 35 µg/mL chloramphenicol and 1% glucose) at 25°C during 20h. Cells were resuspended in lysis buffer 25 mM Tris-HCl pH8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM TCEP (supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche)), and lysed by sonication (7 sec ON / 7 sec OFF, 50% amplitude, 10 min). First step purification is binding on Ni Sepharose 6 Fast Flow resin. After binding, the resin was washed with lysis buffer and the protein was eluted with 25 mM Tris-HCl pH8, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, 10% glycerol, 1 mM TCEP. Eluted protein is concentrated (Amicon Ultra 10K) and diluted in buffer 25 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM TCEP. Second step purification is a gel filtration Superdex 200 increase 10/300 GL (Cytiva) equilibrated with 25 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM TCEP using AKTA Pure instrument (Cytiva). Mw calibration was obtained using Gel Filtration Standard (Bio-Rad).

Gel shift assays

Recombinant HeTDR1 or He-TDR1-GFP was mixed with 10nM of a 5'-Cy5 labelled DNA duplex (57pb Cy5-5'-CCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCCACGGCGTGACAG-TGCTTCAGCC-3' / 5'- GGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGGTTCAGGGTGGTCACGAGGGTGGGCC-AGGGCACGG-3') substrate or its corresponding Cy5 labelled single-strand substrate (57nt) at 25°C for 30 minutes in 10mM Tris-HCl pH8, NaCl 150mM, BSA 0.1mg/mL, Glycerol 2%, TCEP 0.2mM, migrated at room temperature on 4% agarose in TAE 0.5X and Cy5 fluorescence and revealed with ChemiDoc MP imager (Bio-Rad).

For He-TDR1 interaction with plasmid DNA, a 5900bp plasmid (Xie, Kwok, and Scully 2009) 30µM in bp (ie: 5nM in plasmid molecule) was incubated for 10 min at room temperature with 10µM of HeTDR1-GFP in 10mM tris-HCl PH8, 150mM NaCl, 10 Glycerol and 1mM TCEP (storage buffer of the protein). 10µL reaction was observed in Kova counting chamber using with Leica

DMIRE2 40X lens. Images were acquired using Metamorph software, CoolSnap HQ camera and treated with ImageJ software.

Expression of He-TDR1-mNeogreen in *H. exemplaris* tardigrades

Act-He-TDR1-mNeogreen (NG) and Act-mCherry expression plasmids were constructed by Gibson assembly with plasmid backbone from (Loulier et al. 2014). Actin promoter sequences were amplified from *H. exemplaris* genomic DNA, HeTDR1 cDNA from RNA of *H. exemplaris* adult tardigrades and mCherry from a mCherry containing plasmid. Act5C-HeTDR1-GFP and Act5C-mCherry plasmids (2 µg/µL in milliQ water each) were coinjected in starved *H. exemplaris* adults using Quartz micropipets. After 1h of microinjection, animals are let to recover in Volvic mineral water for 15min to 1h15. The electroporation with NEPAGENE21 was carried out in 0,7X Optimem (Gibco, ThermoFisher Life Sciences) with settings from (Tanaka S., et al, Biorxiv, 2022). After 5 days, expression of mCherry expression is checked and best expressing animals are selected for treatment either with ¹³⁷Cs γ-rays (500 Gy) or Bleomycin 100 µM for 2 days. Hoechst 33342 20 µM for 2 days or 40 µM for 1 day is also added to mineral water (Volvic, France) for live staining of the nucleus during imaging by confocal microscopy (Zeiss (LSM 880 and AiryScan module) with x40 and x63 lens) using ZenBlack software.

Expression of TDR1-GFP fusion proteins in human U2OS cells

Expression plasmids for fusion proteins of GFP and tardigrade proteins were constructed by Gibson assembly into pEGFP-N1 (Clontech) of the tardigrade cDNA (obtained by gene synthesis from Integrated DNA) or ordered from Twist Biosciences. Full sequences of fusion proteins are provided as supplementary information. Plasmids were transfected into human U2OS cells (ATCC HTB-96) by Amaxa electroporation with Nucleofector™ Kit V (Lonza) and plated in 6 well plates containing glass slides.

Immunolabeling of phospho-H2AX foci in response to Bleomycin treatment and image analysis

2 days after transfection, Bleomycin sulfate-treated (treatment was for 1h30min with 1 µg/mL Bleomycin sulfate) or control cells were rinsed three times with PBS and fixed with 3,7% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, rinsed three times with PBS, permeabilized with PBS, 0,5% Triton for 15 min, blocked with PBS, 0,1% Tween, 5% Fetal Calf

Serum and incubated for 1h30min with specific anti-GFP (1 in 200 dilution of GFP Chicken polyclonal. Référence: ab13970, Abcam) and anti-phospho H2AX (1 in 800 dilution of BW301, Merck) antibodies. After three PBS, 0,1% Tween washes, cells were incubated with secondary anti-chicken (Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Chicken. Reference: 703-546-155, Jackson Immunoresearch) and anti-mouse (Cy™3 Goat Anti-Mouse. Reference: 115-167-003, Jackson Immunoresearch) antibodies. After three PBS, 0,1% Tween washes, cells were incubated with Hoechst solution (11534886, Invitrogen) diluted 1/5000 in PBS, 0,1% Tween and mounted with ProLong™ Glass Antifade Mountant (P36982, Invitrogen). Cells were next imaged by confocal microscopy (Zeiss LSM 880) using Zenblack software and x40 lens in AiryScan mode acquisition of 7x7 contiguous XY fields and a Z-stack of 30 images at 0,1µm intervals and analyzed with Zen Blue 2.3 software to automatically segment nuclei (using Hoechst staining), identify GFP-positive nuclei and count phospho-H2AX foci therein. When phospho-H2AX staining occupied more than a 1/3 of the nucleus surface, the number of foci was arbitrarily fixed as >400. Statistical significance of the difference in phosphor-H2AX foci was measured with the non-parametric, rank-based Kruskal-Wallis test (using GraphPad Prism 9.3.1 software).

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for the project was from Sorbonne Université (Projet Emergence), INSERM, CNRS and MNHN. M.A. was funded by a doctoral fellowship from Ministère de de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) and Fondation pour la Recherche Médicale. We thank Pr A. Couté, Pr J.S. Sun, Dr JB. Boulé for their support and advice, S. Tanaka and V. Gross for discussion and advice on tardigrade protocols, Dr. C. Sanchez and Dr V. Vivier for access to their quartz needle puller, SSM facility (MNHN) and CNRS UMR7245 for access to the Bioanalyzer, COVALAB for antibody production, Celphedia colleagues for sharing injection protocols and tips. The Genomics ENS Core Facility was supported by the France Genomique National infrastructure, funded as part of the Investissements d'Avenir program (ANR-10-INBS-0009).

REFERENCES

- Arakawa, Kazuharu. 2022. "Examples of Extreme Survival: Tardigrade Genomics and Molecular Anhydrobiology." *Annual Review of Animal Biosciences* 10 (February): 17–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083711>.
- Banneville, Anne-Sophie, Claire Bouthier de la Tour, Salvatore De Bonis, Cécilia Hognon, Jacques-Philippe Colletier, Jean-Marie Teulon, Aline Le Roy, et al. 2022. "Structural and Functional Characterization of DdrC, a Novel DNA Damage-Induced Nucleoid Associated Protein Involved in DNA Compaction." *Nucleic Acids Research* 50 (13): 7680–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac563>.
- Baumann, P., and S. C. West. 1998. "Role of the Human RAD51 Protein in Homologous Recombination and Double-Stranded-Break Repair." *Trends in Biochemical Sciences* 23 (7): 247–51. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01232-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01232-8).
- Beltrán-Pardo, Eliana, K. Ingemar Jönsson, Mats Harms-Ringdahl, Siamak Haghdoost, and Andrzej Wojcik. 2015. "Tolerance to Gamma Radiation in the Tardigrade *Hypsibius Dujardini* from Embryo to Adult Correlate Inversely with Cellular Proliferation." *PLoS One* 10 (7): e0133658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133658>.
- Beltrán-Pardo, Eliana, K. Ingemar Jönsson, Andrzej Wojcik, Siamak Haghdoost, Mats Harms-Ringdahl, Rosa M. Bermúdez-Cruz, and Jaime E. Bernal Villegas. 2013. "Effects of Ionizing Radiation on Embryos of the Tardigrade *Milnesium Cf. Tardigradum* at Different Stages of Development." *PLoS One* 8 (9): e72098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072098>.
- Bolzán, Alejandro D., and Martha S. Bianchi. 2018. "DNA and Chromosome Damage Induced by Bleomycin in Mammalian Cells: An Update." *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* 775: 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.02.003>.
- Bouthier de la Tour, Claire, Martine Mathieu, Laura Meyer, Pauline Dupaigne, Fanny Passot, Pascale Servant, Suzanne Sommer, Eric Le Cam, and Fabrice Confalonieri. 2017. "In Vivo and in Vitro Characterization of DdrC, a DNA Damage Response Protein in *Deinococcus Radiodurans* Bacterium." *PLoS One* 12 (5): e0177751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751>.
- Chavez, Carolina, Grisel Cruz-Becerra, Jia Fei, George A. Kassavetis, and James T. Kadonaga. 2019. "The Tardigrade Damage Suppressor Protein Binds to Nucleosomes and Protects DNA from Hydroxyl Radicals." *ELife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.47682>.
- Ciechanover, Aaron, and Yong Tae Kwon. 2017. "Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration." *Frontiers in Neuroscience* 11: 185. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00185>.
- Cox, Jürgen, and Matthias Mann. 2008. "MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification." *Nature Biotechnology* 26 (12): 1367–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>.
- DaRosa, Paul A., Zhizhi Wang, Xiaomo Jiang, Jonathan N. Pruneda, Feng Cong, Rachel E. Klevit, and Wenqing Xu. 2015. "Allosteric Activation of the RNF146 Ubiquitin Ligase by a Poly(ADP-Ribosyl)ation Signal." *Nature* 517 (7533): 223–26. <https://doi.org/10.1038/nature13826>.
- Doherty, A. J., and S. P. Jackson. 2001. "DNA Repair: How Ku Makes Ends Meet." *Current Biology: CB* 11 (22): R920–924. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00555-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00555-3).
- Fernandez-Capetillo, Oscar, Alicia Lee, Michel Nussenzweig, and André Nussenzweig. 2004. "H2AX: The Histone Guardian of the Genome." *DNA Repair* 3 (8–9): 959–67. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.024>.

Giovannini, Ilaria, Tiziana Altiero, Roberto Guidetti, and Lorena Rebecchi. 2018. "Will the Antarctic Tardigrade *Acutuncus Antarcticus* Be Able to Withstand Environmental Stresses Related to Global Climate Change?" *The Journal of Experimental Biology* 221 (Pt 4): jeb160622. <https://doi.org/10.1242/jeb.160622>.

Gladyshev, Eugene, and Matthew Meselson. 2008. "Extreme Resistance of Bdelloid Rotifers to Ionizing Radiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13): 5139–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800966105>.

Guidetti, Roberto, Michele Cesari, Roberto Bertolani, Tiziana Altiero, and Lorena Rebecchi. 2019. "High Diversity in Species, Reproductive Modes and Distribution within the Paramacrobrotus Richtersi Complex (Eutardigrada, Macrobiotidae)." *Zoological Letters* 5: 1. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0113-z>.

Hashimoto, Takuma, Daiki D. Horikawa, Yuki Saito, Hirokazu Kuwahara, Hiroko Kozuka-Hata, Tadasu Shin-I, Yohei Minakuchi, et al. 2016. "Extremotolerant Tardigrade Genome and Improved Radiotolerance of Human Cultured Cells by Tardigrade-Unique Protein." *Nature Communications* 7: 12808. <https://doi.org/10.1038/ncomms12808>.

Hesgrove, Cherie, and Thomas C. Boothby. 2020. "The Biology of Tardigrade Disordered Proteins in Extreme Stress Tolerance." *Cell Communication and Signaling: CCS* 18 (1): 178. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00670-2>.

Horikawa, Daiki D., John Cumbers, Iori Sakakibara, Dana Rogoff, Stefan Leuko, Raechel Harnoto, Kazuharu Arakawa, et al. 2013a. "Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius Varieornatus* and *Hypsibius Dujardini* after Exposure to UVC Radiation." *PLoS One* 8 (6): e64793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064793>.

———. 2013b. "Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius Varieornatus* and *Hypsibius Dujardini* after Exposure to UVC Radiation." *PLoS One* 8 (6): e64793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064793>.

Jönsson, K. Ingemar. 2019. "Radiation Tolerance in Tardigrades: Current Knowledge and Potential Applications in Medicine." *Cancers* 11 (9): 1333. <https://doi.org/10.3390/cancers11091333>.

Kang, Ho Chul, Yun-Il Lee, Joo-Ho Shin, Shaida A. Andrabi, Zhikai Chi, Jean-Philippe Gagné, Yunjong Lee, et al. 2011. "Iduna Is a Poly(ADP-Ribose) (PAR)-Dependent E3 Ubiquitin Ligase That Regulates DNA Damage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (34): 14103–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108799108>.

Khurana, Simran, Michael J. Kruhlak, Jeongkyu Kim, Andy D. Tran, Jinping Liu, Katherine Nyswaner, Lei Shi, et al. 2014. "A Macrohistone Variant Links Dynamic Chromatin Compaction to BRCA1-Dependent Genome Maintenance." *Cell Reports* 8 (4): 1049–62. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.024>.

Krokan, Hans E., and Magnar Bjørås. 2013. "Base Excision Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4): a012583. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.

Lansonneur, Pierre, Vincent Favaudon, Sophie Heinrich, Charles Fouillade, Pierre Verrelle, and Ludovic De Marzi. 2019. "Simulation and Experimental Validation of a Prototype Electron Beam Linear Accelerator for Preclinical Studies." *Physica Medica: PM: An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology: Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)* 60 (April): 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.03.016>.

Levin-Zaidman, Smadar, Joseph Englander, Eyal Shimoni, Ajay K. Sharma, Kenneth W. Minton, and Abraham Minsky. 2003. "Ringlike Structure of the *Deinococcus Radiodurans* Genome: A

Key to Radioresistance?" *Science (New York, N.Y.)* 299 (5604): 254–56. <https://doi.org/10.1126/science.1077865>.

Loulier, Karine, Raphaëlle Barry, Pierre Mahou, Yann Le Franc, Willy Supatto, Katherine S. Matho, Siohoi Ieng, et al. 2014. "Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels." *Neuron* 81 (3): 505–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.016>.

Lowndes, Noel F., and Geraldine W.-L. Toh. 2005. "DNA Repair: The Importance of Phosphorylating Histone H2AX." *Current Biology: CB* 15 (3): R99–102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.029>.

Mateos-Gomez, Pedro A., Fade Gong, Nidhi Nair, Kyle M. Miller, Eros Lazzerini-Denchi, and Agnel Sfeir. 2015. "Mammalian Polymerase θ Promotes Alternative NHEJ and Suppresses Recombination." *Nature* 518 (7538): 254–57. <https://doi.org/10.1038/nature14157>.

May, R. M. 1964. "Action Différentielle Des Rayons x et Ultraviolets Sur Le Tardigrade *Macrobiotus Areolatus*, a l'état Actif et Desséché." *Bull. Biol. France Belgique* 98: 349–67.

Mohsin Ali, Mohammed, Satofumi Kurisu, Yoshihiro Yoshioka, Hiroaki Terato, Yoshihiko Ohyama, Kihei Kubo, and Hiroshi Ide. 2004. "Detection of Endonuclease III- and 8-Oxoguanine Glycosylase-Sensitive Base Modifications in Gamma-Irradiated DNA and Cells by the Aldehyde Reactive Probe (ARP) Assay." *Journal of Radiation Research* 45 (2): 229–37. <https://doi.org/10.1269/jrr.45.229>.

Pascal, John M. 2018. "The Comings and Goings of PARP-1 in Response to DNA Damage." *DNA Repair* 71 (November): 177–82. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.022>.

Pearce, Linda L., Michael W. Epperly, Joel S. Greenberger, Bruce R. Pitt, and Jim Peterson. 2001. "Identification of Respiratory Complexes I and III as Mitochondrial Sites of Damage Following Exposure to Ionizing Radiation and Nitric Oxide." *Nitric Oxide* 5 (2): 128–36. <https://doi.org/10.1006/niox.2001.0338>.

Regier, Jerome C., Jeffrey W. Shultz, Robert E. Kambic, and Diane R. Nelson. 2005. "Robust Support for Tardigrade Clades and Their Ages from Three Protein-Coding Nuclear Genes." *Invertebrate Biology* 123 (2): 93–100. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2004.tb00145.x>.

Rothkamm, Kai, Stephen Barnard, Jayne Moquet, Michele Ellender, Zohaib Rana, and Susanne Burdak-Rothkamm. 2015. "DNA Damage Foci: Meaning and Significance." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56 (6): 491–504. <https://doi.org/10.1002/em.21944>.

Tanaka, Masashi, Ashlee M. Earl, Heather A. Howell, Mie-Jung Park, Jonathan A. Eisen, Scott N. Peterson, and John R. Battista. 2004. "Analysis of *Deinococcus Radiodurans*'s Transcriptional Response to Ionizing Radiation and Desiccation Reveals Novel Proteins That Contribute to Extreme Radioresistance." *Genetics* 168 (1): 21–33. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029249>.

Tanaka, Sae, Kazuhiro Aoki, and Kazuharu Arakawa. 2022. "In Vivo Expression Vector Derived from Anhydrobiotic Tardigrade Genome Enables Live Imaging in Eutardigrada." Preprint. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.21.508853>.

Téoule, R. 1987. "Radiation-Induced DNA Damage and Its Repair." *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 51 (4): 573–89. <https://doi.org/10.1080/09553008414552111>.

Timmins, Joanna, and Elin Moe. 2016. "A Decade of Biochemical and Structural Studies of the DNA Repair Machinery of *Deinococcus Radiodurans*: Major Findings, Functional and Mechanistic Insight and Challenges." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 14: 168–76. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.04.001>.

Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D. D. Lasko, M. Weinfeld, and K. W. Caldecott. 2001. "XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity

at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair." *Cell* 104 (1): 107–117. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00195-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00195-7).

Wieczorek, Samuel, Florence Combes, Cosmin Lazar, Quentin Gai Gianetto, Laurent Gatto, Alexia Dorffer, Anne-Marie Hesse, et al. 2017. "DAPAR & ProStaR: Software to Perform Statistical Analyses in Quantitative Discovery Proteomics." *Bioinformatics (Oxford, England)* 33 (1): 135–36. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw580>.

Xie, Anyong, Amy Kwok, and Ralph Scully. 2009. "Role of Mammalian Mre11 in Classical and Alternative Nonhomologous End Joining." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (8): 814–18. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1640>.

Yoshida, Yuki, Daiki D. Horikawa, Tetsuya Sakashita, Yuichiro Yokota, Yasuhiko Kobayashi, Masaru Tomita, and Kazuharu Arakawa. 2021. "RNA Sequencing Data for Gamma Radiation Response in the Extremotolerant Tardigrade *Ramazzottius Varieornatus*." *Data in Brief* 36 (June): 107111. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107111>.

Yoshida, Yuki, Georgios Koutsovoulos, Dominik R. Laetsch, Lewis Stevens, Sujai Kumar, Daiki D. Horikawa, Kyoko Ishino, et al. 2017. "Comparative Genomics of the Tardigrades *Hypsibius Dujardini* and *Ramazzottius Varieornatus*." *PLoS Biology* 15 (7): e2002266. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002266>.

Yoshida, Yuki, Tadashi Satoh, Chise Ota, Sae Tanaka, Daiki D. Horikawa, Masaru Tomita, Koichi Kato, and Kazuharu Arakawa. 2022. "Time-Series Transcriptomic Screening of Factors Contributing to the Cross-Tolerance to UV Radiation and Anhydrobiosis in Tardigrades." *BMC Genomics* 23 (1): 405. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08642-1>.

Zahradka, Ksenija, Dea Slade, Adriana Bailone, Suzanne Sommer, Dietrich Averbeck, Mirjana Petranovic, Ariel B. Lindner, and Miroslav Radman. 2006. "Reassembly of Shattered Chromosomes in *Deinococcus Radiodurans*." *Nature* 443 (7111): 569–73. <https://doi.org/10.1038/nature05160>.

Zaitseva, E. M., E. N. Zaitsev, and S. C. Kowalczykowski. 1999. "The DNA Binding Properties of *Saccharomyces Cerevisiae* Rad51 Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (5): 2907–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.2907>.

Zhang, Yue, Shanming Liu, Craig Mickanin, Yan Feng, Olga Charlat, Gregory A. Michaud, Markus Schirle, et al. 2011. "RNF146 Is a Poly(ADP-Ribose)-Directed E3 Ligase That Regulates Axin Degradation and Wnt Signalling." *Nature Cell Biology* 13 (5): 623–29. <https://doi.org/10.1038/ncb2222>.

FIGURES

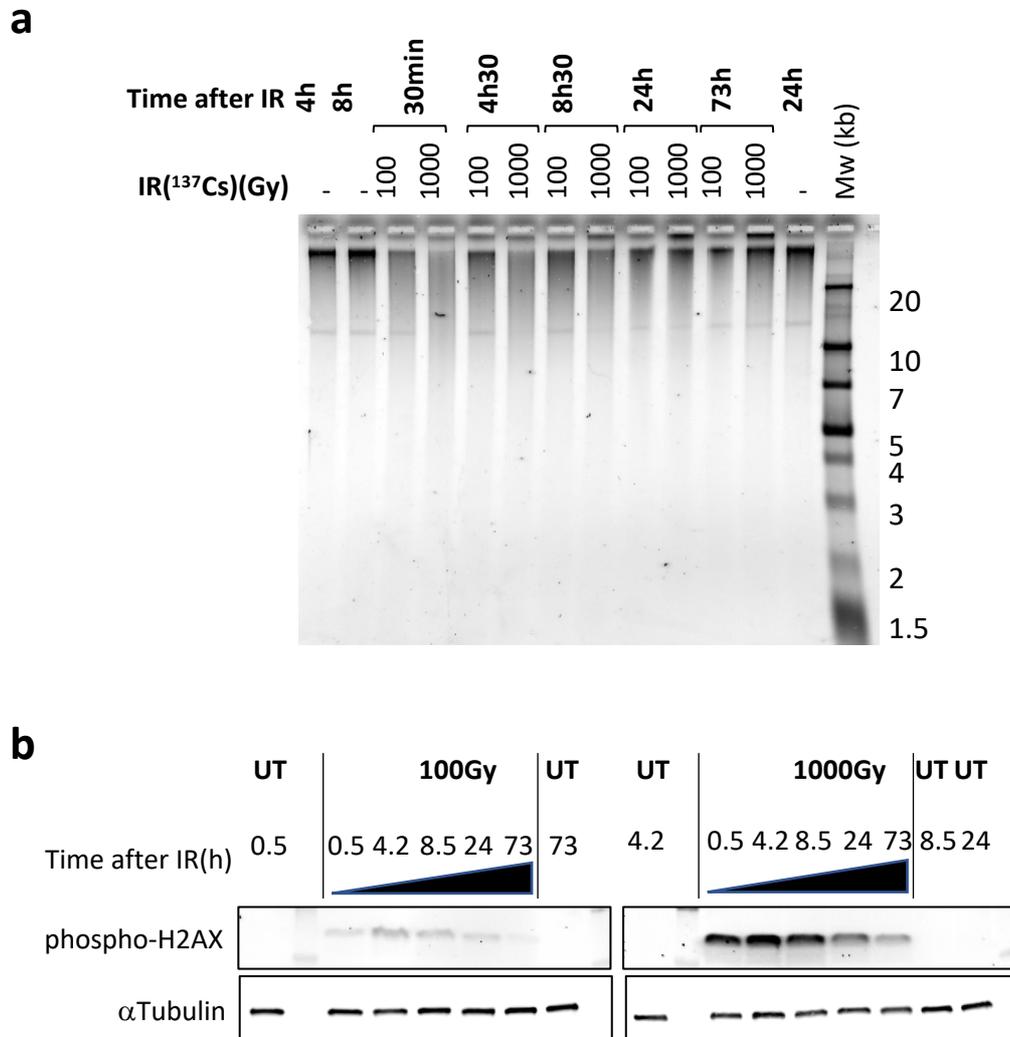


Figure 1 Analysis of DNA fragmentation after γ -ray irradiation

(a) Analysis of single strand breaks by denaturing agarose gel electrophoresis of DNA isolated from ~8000 *H. exemplaris* individuals at different timepoints post-irradiation (100Gy or 1000Gy γ -rays from ¹³⁷Cs source). (-) lanes show DNA from control, non-irradiated tardigrades. MW corresponds to the Molecular Weight ladder (kb is shown on the right). Denaturing gel was 0.9% agarose/ 30 mM NaOH/1 mM EDTA with SyBRGreen staining.

(b) Analysis of phospho-H2AX expression after exposure of *H. exemplaris* to IR Western blot analysis with in-house antibody against phosphorylated *H. exemplaris* H2AX (anti-phospho-H2AX) at indicated timed points after irradiation of *H. exemplaris* tardigrades. Phospho-H2AX levels were normalized by total α tubulin expression levels and quantification is provided in supp Figure 1c. UT stands for Untreated.

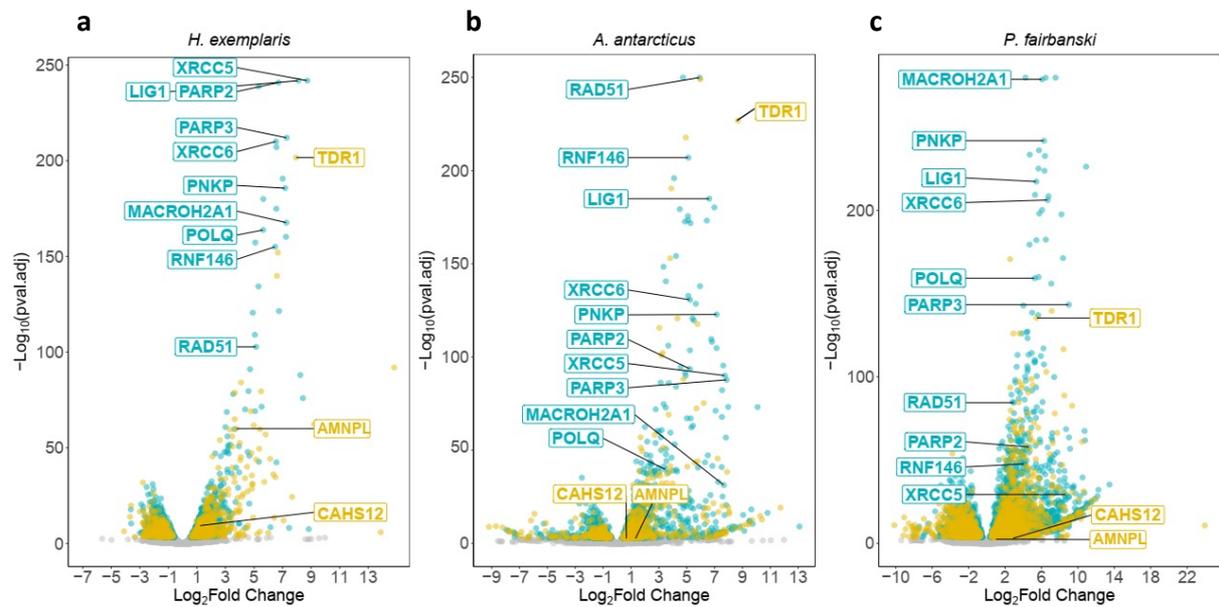


Figure 2 Transcriptomic response to IR in three tardigrade species, *H. exemplaris*, *A. antarcticus* and *P. fairbanksi*

Volcano plots representing Log₂ fold change (log₂ FC) and adjusted p-value ($-\log_{10}$ of RNA levels between tardigrades irradiated with 1000Gy γ -rays and untreated controls from *H. exemplaris* ($n=3$) (a), *A. antarcticus* ($n=3$) (b) or *P. fairbanksi* ($n=4$) (c) species.

Grey points represent transcripts with Log₂ FC of adjusted p value $p \geq 0.05$. The blue dots represent transcripts with homologs in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans with a Fold Change (FC) of adjusted p-value $p < 0.05$. The mustard dots represent transcripts with no homologs in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans with a FC of adjusted p-value $p < 0.05$. Are indicated: genes commonly upregulated in the 3 species and, either representative of the different DNA repair pathways or specific to tardigrades and already known to be involved in oxidative stress or desiccation tolerance, as well as the TDR1 gene identified in this work. AMNPL stands for AMNP-like and refer to the cluster genes homologue to AMNP/g12777 upregulated in response to desiccation and UVC (Yoshida et al 2020)

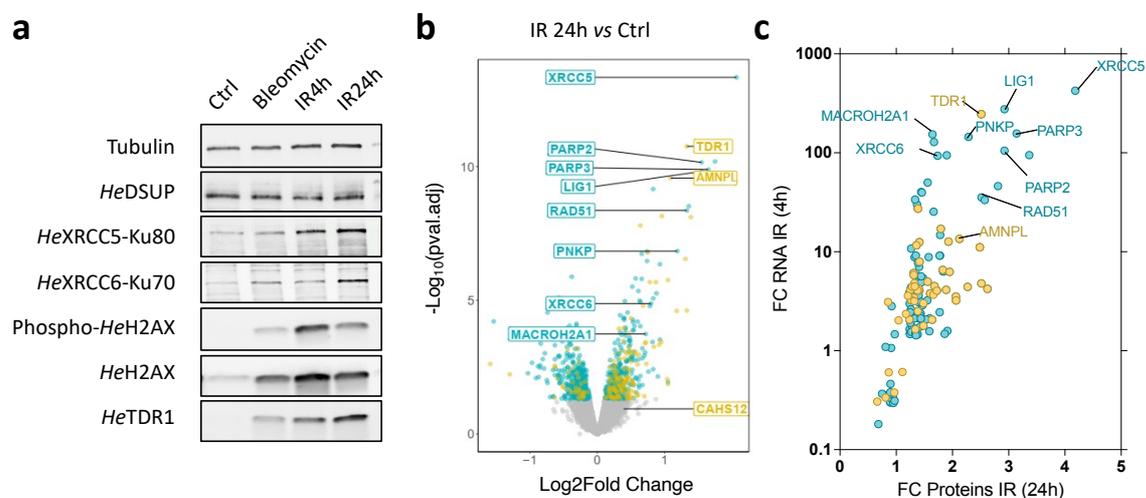


Figure 3 Changes in protein expression in *H. exemplaris* after exposure to IR

(a) Western blot analysis of *He*-TDR1, *He*-XRCC5, *He*-XRCC6 (among the most strongly stimulated genes at the RNA level) and *He*-Dsup (not stimulated at the RNA level) in irradiated *H. exemplaris* tardigrades untreated (Ctrl) or treated with either 100 μ M Bleomycin during 4 days, 1000Gy γ -rays and extracts prepared at indicated times post-irradiation

(b) Volcano plot representing Log2 fold change (log2 FC) with adjusted p-value ($-\log$ base 10) of proteins between tardigrades irradiated with 1000Gy γ -rays and untreated controls from *H.exemplaris*.

Grey points represent proteins with Log2(FC) of adjusted p value $p \geq 0.05$. The blue dots represent proteins with homologs in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans with a fold change (FC) of adjusted p-value $p < 0.05$. The mustard dots represent proteins with no homologs in *C. elegans*, *D. melanogaster* or humans with a fold change (FC) of adjusted p-value $p < 0.05$. ($n=4$)

(c) Correlation between Fold Changes of protein levels, as estimated in (b), and RNA levels, as estimated in Figure 2a.

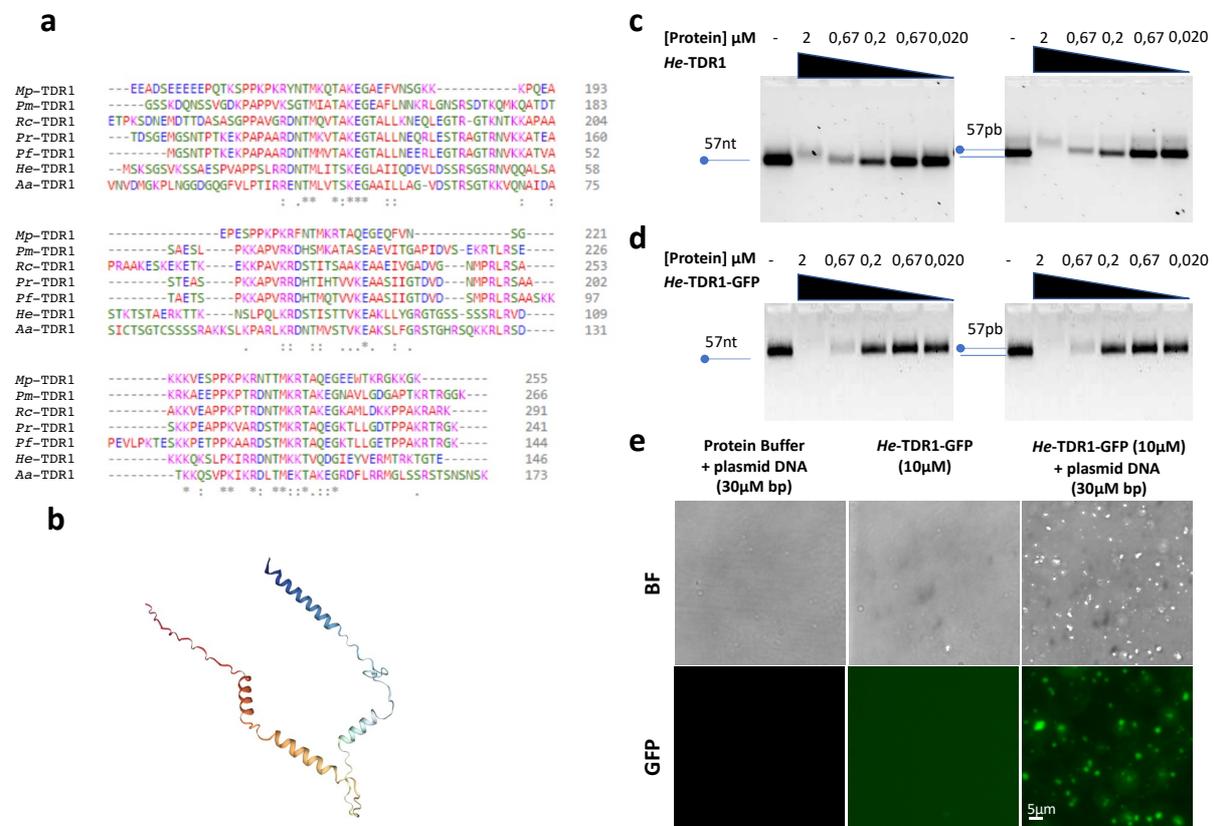


Figure 4 He-TDR1 interacts directly with DNA

(a) Sequence alignment of TDR1 proteins conserved C-terminal domain from *H. exemplaris* (He-TDR1), *A. antarcticus* (Aa-TDR1), *M. philippinicus* (Mp-TDR1), *P. metropolitanus* (Pm-TDR1), *R. coronifer* (Rc-TDR1), *P. richtersi* (Pr-TDR1), *P. fairbanksi* (Pf-TDR1), (“*” indicates fully conserved residue; “:” and “.” indicate sites belonging to groups showing strong and weak similar properties, respectively).

(b) Alpha-fold model prediction of He-TDR1 protein structure.

(c-d) Gel shift assay of purified He-TDR1 **(c)** or He-TDR1-GFP **(d)** on 10nM of a 5'-Cy5 labelled DNA duplex (57pb) substrate (right panel) or its corresponding single-strand substrate (57nt) (left panel). Reactions incubated with indicated concentration of proteins at 25°C for 30 minutes and migrated at room temperature on 4% agarose and Cy5 fluorescence was revealed with ChemiDoc MP imager.

(e) Brightfield and GFP fluorescence imaging of plasmid DNA 10 μM in bp (5900bp) incubated in presence of 10 μM of He-TDR1-GFP (10 min at 25°C in 10mM Tris-HCl pH8, NaCl 150mM, Glycerol 10%, 1mM TCEP). No aggregates are observed with the DNA or the protein alone. Large condensates of DNA with the protein are observed both in bright-field and in fluorescence microscopy as a result of the binding of He-TDR1-GFP. (Same condensates are observed in bright-field for HeTDR1 (data not shown).

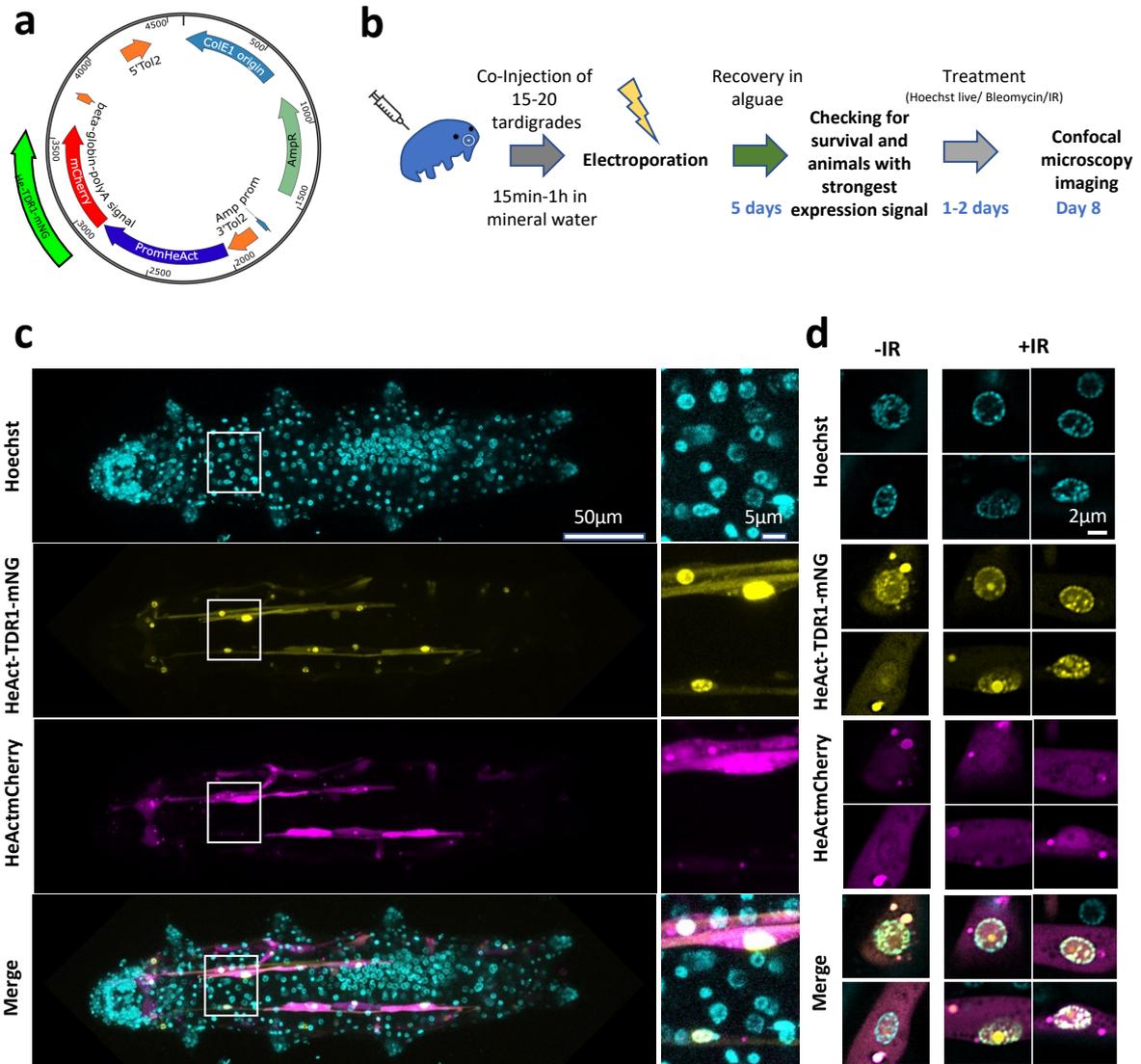


Figure 5 Expression of *He*-TDR1-mNeonGreen in transient transgenic *H. exemplaris* tardigrades

(a) Expression plasmid of *He*-TDR1-mNeonGreen (mNG) and mCherry under the Actin promoter (850bp).

(b) Experimental scheme for microinjection and electroporation of expression plasmids into adult *H. exemplaris* tardigrades, selection of best expressing animals, treatments and imaging. Treatment was with either ^{137}Cs γ -rays (500 Gy) or treatment with 100 μM Bleomycin for 2 days.

(c)-(d) Confocal microscopy was carried out on live animals immobilized in carbonated water at day 8 post-microinjection, after 2 days of treatment with 100 μM Bleomycin and 20 μM Hoechst 33342 (c) or 24h after irradiation and 1 day of incubation with 40 μM Hoechst 33342 (d). Airyscan2 module is used in d) for high resolution imaging of nuclei expressing *He*-TDR1-mNG and Hoechst staining of the nucleus. Nuclear localization of *He*-TDR1-mNG is observed with co-localization with Hoechst staining except for 1 big foci which was observed in some high-resolution images (d-yellow channel).

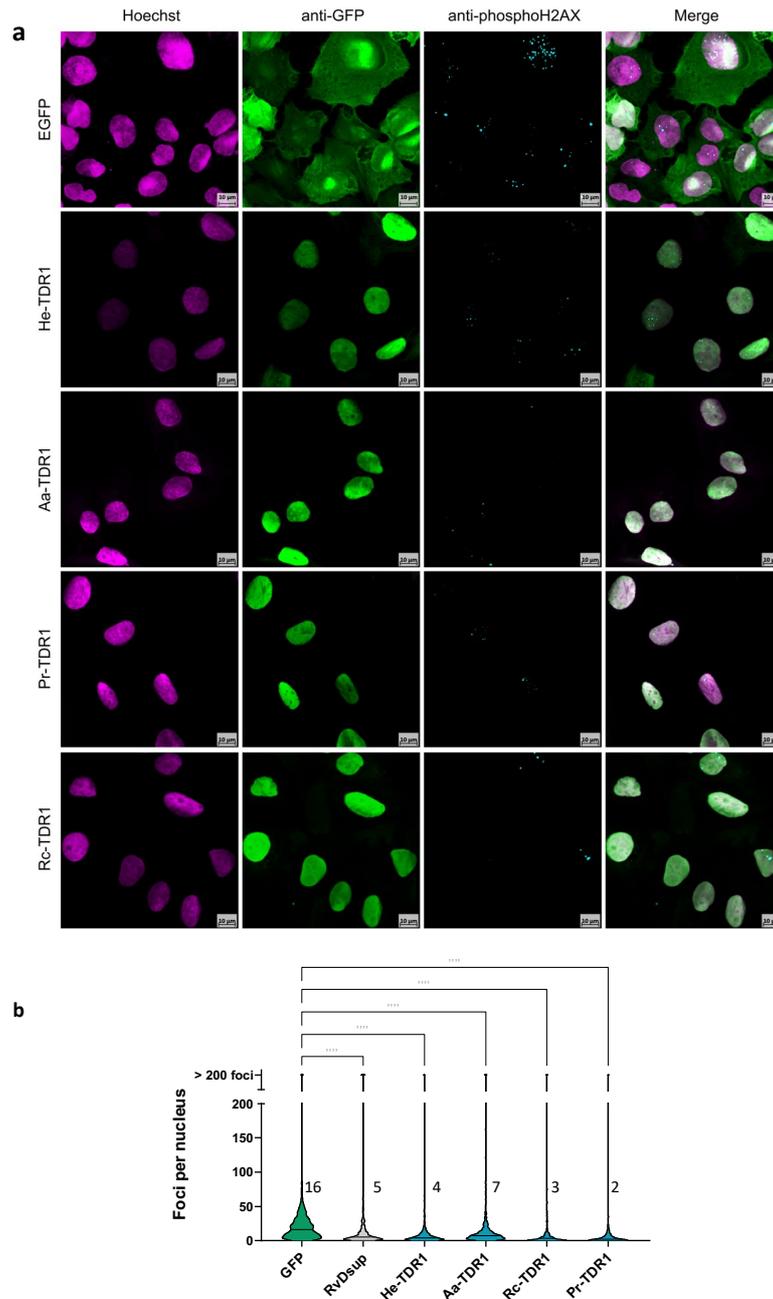


Figure 6 Reduced formation of phospho-H2AX foci after Bleomycin treatment of human U2OS cells expressing TDR1-GFP from multiple tardigrade species

(a) Analysis of subcellular localization of indicated TDR1-GFP fusion proteins (*H. exemplaris* (He-TDR1), *A. antarcticus* (Aa-TDR1), *R. coronifer* (Rc-TDR1), *P. richtersi* (Pr-TDR1)) by confocal fluorescence microscopy. Expression plasmids for indicated proteins were electroporated into U2OS cells. 2 days later, transfected cells were treated with $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Bleomycin during 1 hour, fixed with a 4% PFA PBS solution for 1h, immunolabeled with chicken anti-GFP and mouse anti-phospho-H2AX antibodies.

(b) Violin plot of the number of phospho-H2AX foci per nucleus is shown. Phospho-H2AX foci were counted after $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Bleomycin treatment of U2OS cells electroporated with a plasmid expressing either eGFP (control), a fusion of RvDsup and GFP (RvDsup-GFP) or fusions of indicated TDR1 protein and GFP. **** $P < 0.0001$; NS not significant (Kruskal-Wallis Test). A minimum of 330 nuclei were counted in each experimental condition. A representative experiment is shown here. Data from independent replicates is given in supp Figure 9.

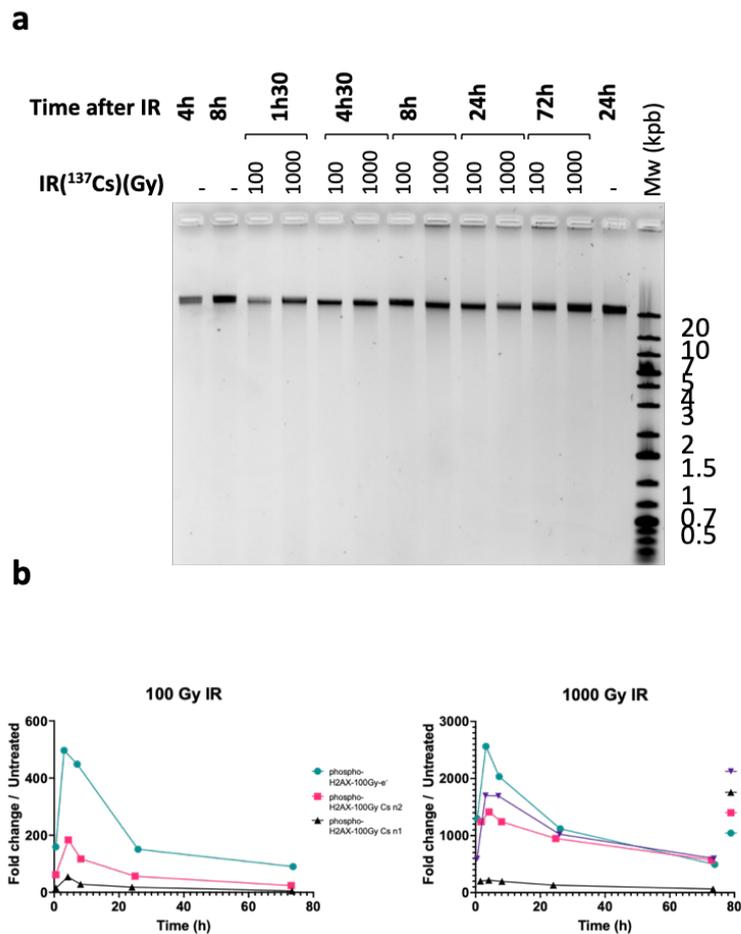
γ Irradiation vs Control	<i>H.exemplaris</i> pValue.adj <0.05	<i>A.antarcticus</i> pValue.adj <0.05	<i>P.fairbanksi</i> pValue.adj <0.05	Bleomycin vs Control	<i>H.exemplaris</i> pValue.adj <0.05	<i>A.antarcticus</i> pValue.adj <0.05
Total number of DEG	6209	4740	13733	Total number of DEG	5116	1675
Number of DEG Up	3178	2625	7017	Number of DEG Up	2284	562
Number of DEG Down	3031	2115	6716	Number of DEG Down	1113	1113
Total Number of annotated DEG (unique element)	4333 (3369)	3360 (2298)	8660 (3943)	Total Number of annotated DEG (unique element)	3664 (2461)	829 (597)
Number of annotated DEG Up	2293	1832	4714	Number of annotated DEG Up	1493	316
Number of annotated DEG Down	2040	1528	3946	Number of annotated DEG Down	2171	513
Commun number of annotated DEG (unique element)	977			Commun number of annotated DEG (unique element)	317	
Total Number of putative Tardigrade specific DEG	1642	1203	4588	Total Number of putative Tardigrade specific DEG	1602	942
Number of putative Tardigrade specific DEG Up	812	715	2133	Number of putative Tardigrade specific DEG Up	724	340
Number of putative Tardigrade specific DEG Down	830	488	2455	Number of putative Tardigrade specific DEG Down	602	602
Commun number of putative Tardigrade DEG	108			Commun number of putative Tardigrade DEG	182	
IR & Bleo Commun number of putative Tardigrade DEG	25					

Table 1: Number of differentially expressed genes (adjusted pValue < 0,05) IR vs untreated in 3 species (*H. exemplaris*, *A.antarcticus*, *P.fairbanksi*) and Bleomycin 4 days in *H.exemplaris* and *A.antarcticus*. Number of commun annotated genes are shown (unique element corresponding to the number of different geneID in the list). Number of gene that have no homology with model organism database are also reported as tardigrade DEG. A total of 108 tardigrade genes are commun to the 3 species in response to IR and 182 commun to *He* and *Aa* in response to Bleomycin treatment. The list of the 25 candidates commun to both treatment is given in supp Table 6.

γ Irradiation vs Control	<i>IR4h vs Ctrl</i> Pval<0,01	<i>IR24h vs Ctrl</i> Pval<0,01	<i>Bleomycin vs Ctrl</i> Pval<0,01
Total number of Identified Proteins		5625	
Total number of DE Proteins	58	266	185
Number of DE Proteins Up	42	168	128
Number of DE Proteins Down	16	98	57
Commun number of DE Proteins		36	
Total Number of Tardigrade specific DE protein	13	61	70
Number of Tardigrade specific DE protein Up	11	52	47
Number of Tardigrade specific DE protein Down	2	9	23
Commun number of Tardigrade specific DEG		9	

Table 2: Proteomic analysis metrics: number of differentially expressed proteins (pValue < 0,01 and log2FoldChange<-0,3 or >0,3) in each condition for tardigrade *H.exemplaris*. Number of protein that have no homology with model organism database are also reported as tardigrade specific. Finally 9 proteins with no homologue in model species were common to 3 treatments. The list of the 25 candidates common to both treatment is given in supp Table 7.

SUPPLEMENTARY FIGURES

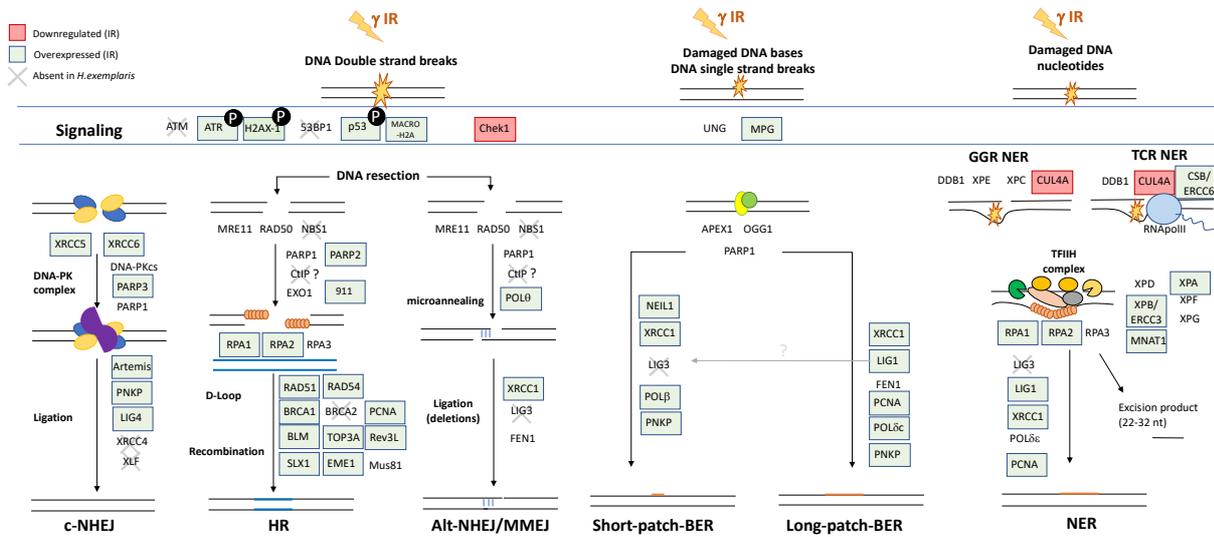


Supp Figure 1 Analysis of DNA fragmentation after γ -ray irradiation

(a) Analysis of double-strand breaks by native agarose gel electrophoresis of DNA isolated from ~ 8000 *H. exemplaris* individuals at different timepoints post-irradiation (100Gy or 1000Gy γ -rays from ¹³⁷Cs source). (-) lanes show DNA from control, non-irradiated.

(b) Quantifications of phospho-H2AX kinetics after ¹³⁷Cs gamma irradiation or accelerated electronic beam irradiation as indicated.

a



b

term_name	Base excision repair		Nucleotide excision repair		Mismatch repair		Homologous recombination		Non-homologous end-joining		Fanconi anemia pathway	
term_id	KEGG:03410		KEGG:03420		KEGG:03430		KEGG:03440		KEGG:03450		KEGG:03460	
Species	<i>A. antarcticus</i>	<i>H. exemplaris</i>	<i>A. antarcticus</i>	<i>H. exemplaris</i>	<i>A. antarcticus</i>	<i>H. exemplaris</i>	<i>A. antarcticus</i>	<i>H. exemplaris</i>	<i>A. antarcticus</i>	<i>H. exemplaris</i>	<i>A. antarcticus</i>	<i>H. exemplaris</i>
Differentially expressed genes	LIG1	LIG1	ERCC3	ERCC3	LIG1	LIG1	BLM	BLM	LIG4	LIG4	BLM	BLM
			ERCC5	ERCC5			MRE11	MRE11				
			ERCC6	ERCC6	PMS2	PCNA	POLD1	MUS81		POLL		
					POLD1	POLD1	POLD2	POLD2				
					POLD2	POLD2	POLD4	POLD4				
					POLD4	POLD4	RPA2	RPA2				

Supp Figure 3 DNA repair genes of major repair pathways of DNA damages inflicted by IR are upregulated in all three species studies

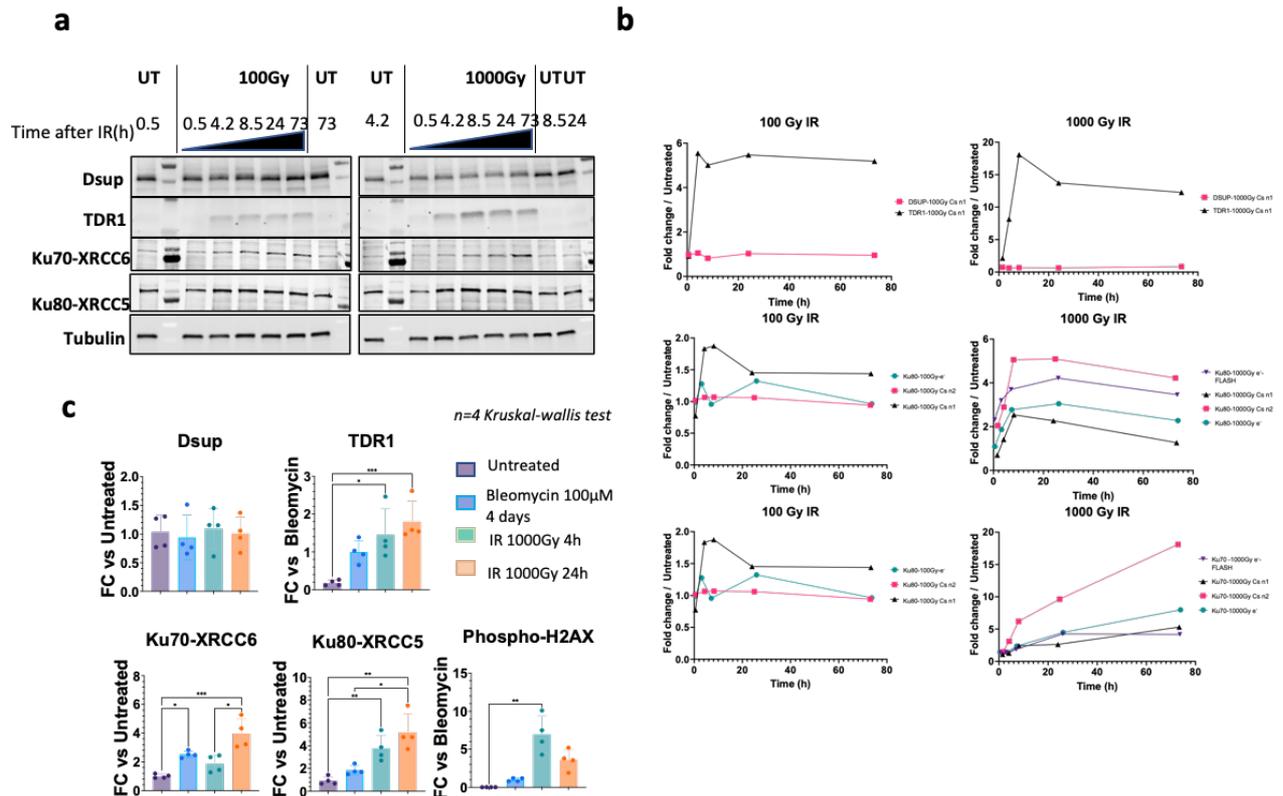
(a) Schematic representation of DNA repair genes up- or down regulated in *H. exemplaris* after IR.

Genes in blue colored boxes are upregulated with adjusted p-value < 0.05.

Genes in red colored boxes are downregulated with adjusted p-value < 0.05.

Genes with no homolog identified in *H. exemplaris* genome are checked with a black cross.

(b) Table of DNA repair genes up- or down regulated in *H. exemplaris*, *A. antarcticus*, *P. fairbanksi* after IR, classified based on KEGG database; note that the MMEJ pathway is not indicated in KEGG and POLQ gene indicated in the BER pathway. Only genes showing differential gene expression with adjusted p value < 0.05 are shown

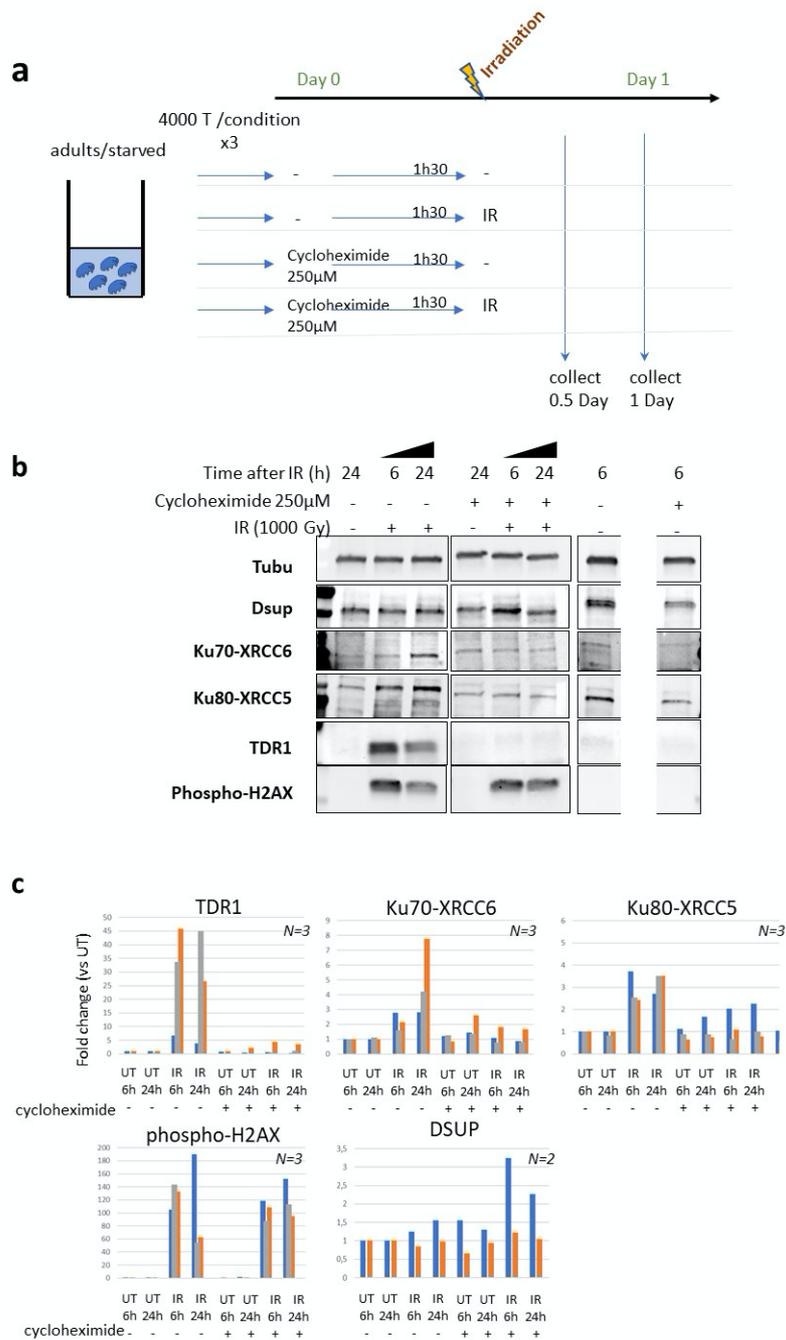


Supp Figure 4: Expression of selected proteins by western blot and quantifications

(a) Kinetics of protein expression after g-irradiation (100Gy (left) and 1000Gy (right) assessed by western blots with antibodies against *HeDsup*, *HeTDR1*, *HeKu70-XRCC6*, *HeKu80-XRCC5* and alpha-Tubulin for normalization.

(b) Quantification of western blots presented in (a)(dark blue triangle) and other experiments carried out with accelerated electron beam (first time point 30min after irradiation start)(green dot or purple triangle (FLASH mode)) or another g-irradiation with ^{137}Cs (pink square except in the upper panel where Dsup quantification of (a) is presented also with a pink square). Signal is normalized with tubulin.

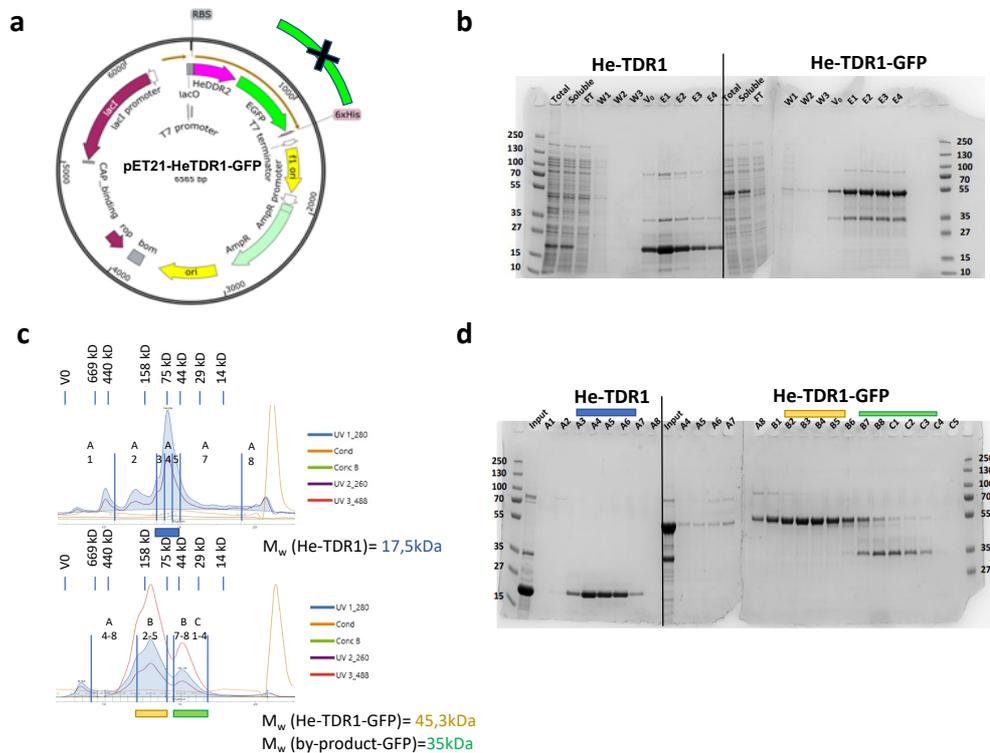
(c) Quantification of western blots obtained (n=4) before differential proteomic analysis in Figure 3 (normalized to tubulin signal). FC stands for Fold Change. For low amount of protein in untreated tardigrades, FC was established vs Bleomycin treatment (normalized to 1 in TDR1 and phospho-H2AX western blots quantifications). Kruskal-wallis statistical test * p-value<0.05 ** p-value<0.005 ***p-value<0.0005.



Supp Figure 5 Impact of cycloheximide on protein levels in *H. exemplaris* after exposure to IR
(a) Experimental set up.

(b) Western blot analysis of TDR1, XRCC5, XRCC6 (among the most strongly stimulated genes at the RNA level) and Dsup (not stimulated at the RNA level) in irradiated *H. exemplaris* tardigrades untreated (-) or treated with 1000Gy γ -rays and extracts prepared at indicated times post-IR

(c) Quantification of western blots (normalized to tubulin signal)



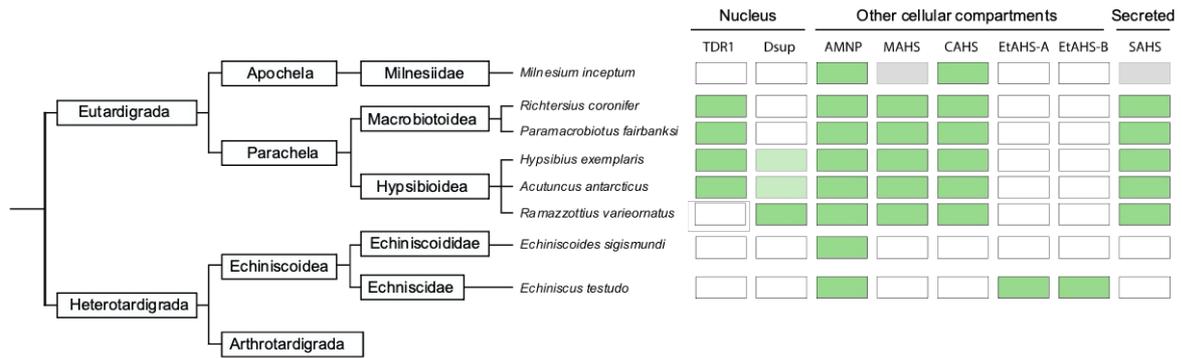
Supp Figure 6 Production of recombinant *He-TDR1* and *He-TDR1-GFP*

(a) Vector construct for expression in *E.coli* Rosetta2(DE3): *He-TDR1* (Mw= 17,5kDa) and its GFP fusion (Mw= 45,3kDa) are His-tagged in C-term for affinity purification on Nickel sepharose beads.

(b) SDS-PAGE after His-TRAP sepharose beads chromatography (Instant blue stained). Both proteins are soluble. Fraction V0 to E4 were collected and concentrated on 10kDa MWCO Amicon for gel filtration.

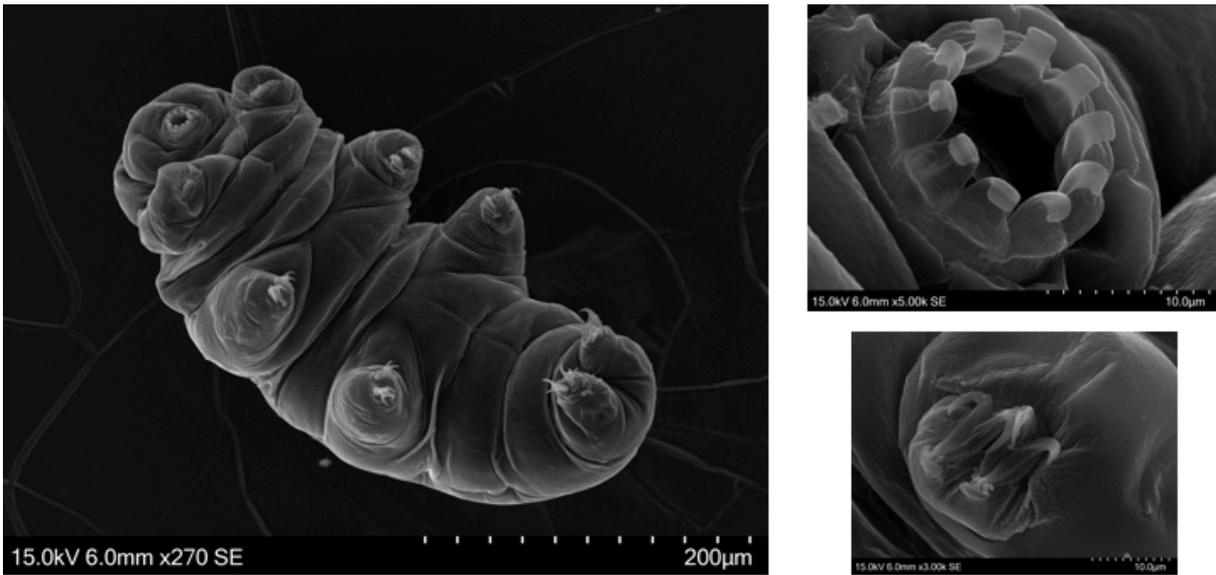
(c) Chromatogram (UV absorbance at 260nm, 280nm and 488nm for GFP).

(d) SDS-PAGE of corresponding fractions obtained after Superdex 200 Increase gel filtration (Cytivia) for *He-TDR1* (C upper panel) and *He-TDR1-GFP* (C bottom panel). V0 and Mw calibration protein volume are reported for comparison to the apparent Mw of *He-TDR1* (purified protein peak shown in blue) and *He-TDR1-GFP* (purified protein peak shown in yellow) (by-product GFP protein is also purified (shown in green) and serves as internal Mw control). Apparent Mw of *He-TDR1* and its GFP fusion is higher than expected and suggest a possible multimerization of the protein.

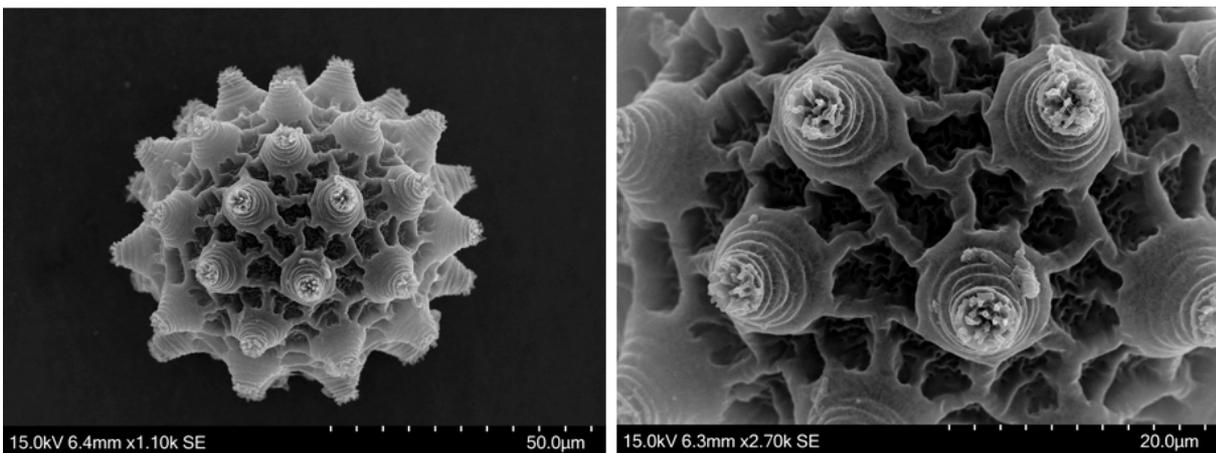


Supp Figure 7 Phylogenomics of tardigrade unique genes involved in resistance to desiccation and DNA damages (adapted from Arakawa, 2022)

a



b



Supp Figure 8. Identification of *P. fairbanksi*

(a) TEM of adult specimen with magnification of mouth and claws.

(b) TEM of egg with magnification of characteristic spikes decorating the egg surface.

Bright-field morphological analysis confirmed *P. fairbanksi* identification (R. Guidetti, data not shown). Species identification was further confirmed by 28S, 18S, COX1, ITS2 sequencing (see next page).

>Pdec_18S

ATCTGATCGGAACAGAACTGAACGCAGTTC AAGAGCGCTCAGGATTACTTGTAGCGTGCAAGTATATATCTGACTCGA
TACGTGCTCGTTGGTATGGTATGCATTCTC TCATCGCTTGACGGGTATGAATTGCGAGCCATCTGTGCCGCTGCCCA
GAAGGTAAGCACAAAACGCATATCGCTGTAAACCTGGCCAGCGCAGTGAAGCTGGTGTCTAGGATACTGTTCGATGGTTG
TTCTAACACTCCTACTGCGTCGAAGTTGCAGCAGCGCTTACGCGCTTACCGACCGATGTAGTACGTGGACAGGTACGCGT
TTCTCGCTTGTATGCGTTGTGTAGCGTGCACAGCGGACAACGATGGAACAGTATCCGATAAAAATGTCCAATGATTGCTA
CCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTCAGTACTTGTCTATCACAGGGC
AAACCGCAATGGCTCATTAATCAGTTATGGTTACTAGATCGTACC GTTTACACGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGC
TAATACGTGC AACCAGCTCGTTTCCTCGTGAAGCGAGCGCAGTTATTAGAACAAGACCAATCCGGCTTCGGGTCCGGTAA
CTTGGTGACTCTGAATAACCGAAGCAGAGCGCATGGTCTCGTACCGGCGCCAGATCTTTCAAGTGTCTGACTTATCAGCT
TGTTGTTAGGTTATGTTCC TAAACAGGCTATTACGGGTGACGGGTATCAGGGTCCGATAACCGGAGAGGGAGCCTGAGAA
ACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCAGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACG
ATGCGAGGGCTTTATGCCTCFCGAATCGGAATGGGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCT
GGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATCTG
GGCAGTTGGACGGATGGTGCCTTCACAGCGCTACTGTCTGCTCGGCGCCACAAGCCGGCCATGTCTTGCATGCCCTTCA
CTGGGTGTGCTTGGCGACCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGTACGGCTTGCATAATGGT
GCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTCGGAACTCGAGGTAATGATTAATAGGAACAGACGG
GGCATTTCGATTTGCGGCGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGTCGAAGACGAACTACTGCGAAGGCATTTGCCAAGAA
GTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCAAGGGCATCAGATACCGCCCTAGTTCTAACCATAAACGATGCCAA
CCAGCTACCGTCCGGTGTTAATTTGATGACTCGACGGGCAGTTTCGGGAAACCAAAGTGCTTAGTTCCGGGGGAGTA
TGTTTGC AAGCTGAAACTTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTAACA
CGGGA AACTTACCGGCCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGTGGTGGTGCAT
GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGCCAACTG
ATCCGCAGCGTCAAGTTGCTACAAAAGCTTCTTAGAGGGACAGGCGGCTTTAGTGCACAGAGATTGAGCAATAACAGGTC
TGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGACGCGCTACACTGAAGGGAGCAACGTGCTTAATCACCTTGGCCGGAAGGC
CTGGGGAATCCGATTAAACCCCTTCGTGATTGGGATTGAGCTTTGTAATTATCGCTCATGAACGAGGAATCCAGTAAG
CGCGAGTCATAAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGCTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAG
TGAGGCTTTCGGACTGGCCATCGAGGCTGCCGAAGGCGGCTTCGTCTGGTTGGGAAGACGACCAAACCTGGCTCATTTAG
AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCCGAAGGATCATTAACGTGTAATCGGGCGGCTGTGCCCT
GTGCGCTAGGTTCTTCGGGCTGGCCGGGTGCCGCTCGTACCGGATAAGCGCTTCTAGCGCTTAACCTGAAAGTCGAGT
CTACAGCAACGGTGACTCGCCTATCGTTACTATCCGGAGCGTTTGGTCAGCAATCGCAGCGTGTCTTGGCCACTGCCGGG
GTACCGTAGTGAAC TGTTAACTTCGGTACACCCGTCGCATGTTGATTTACCTGTTCGGAGCGTGAACGGGTGGTTCGACACTG
TAATGGCTGTGCCACGGGATACCTACCGTTCTACAAGACGATGCTCTGCGGTCGCTTGAATAACTCACGCGAGACCGTGG
AGAGGCATTCGCCGTAGAATGAGGGCCAGCAGCGCCCAAGGGTATAAAGTAGCTGCAACGAGCGTCTTGGCCGTTATAT
CCACGATAACGCATCTGTCTGGGTATATACCGAATTGGCCGTC CCGCTGCATTTTC

>Pdec ITS2

TCAAAGTGC TTTTCAATTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGACTCGTGGTCAATATTTAGCCTTCGATGGAGTTA
CCACCGACTTCACCTTGACTCACAAACAAGGCGACTCTCCGAAGATGTACACCGGCATCAACTGCTCAGGATACGGGCC
TTGCACCCCTCCATGGGATGGAGCCTCACTCAGGAGAACTTACGAAGCAAGCCACACCGGTAACCACCTTCTTCAGCCA
CAGTTCCCTGTACCGTTACCAGCAACAGGATTCGGCGCTGGGCTGTTCCTTCTACTCGCAGTTACTATGGGAATCCCC
GTTGGTTCTTTTCTCCGCTTAGTAATATGCTTAAGTTTACGCGGGTAATCTCGTCTGAGCTGAGGTCAAAAGATGAGTG
TAGCAAGGCGCAAGTATCTTACGGCCCTGTTCTACAGTTTACTTGTCTCCGTAGATTGGGACCTGTTACCGCTCAAC
GCATAGTTGGCACAGATACCGCACGAACGTGTTCTGTTTTGCTGAACCACTGAAGTGCCGTTGGCAGTAAATCGATACAC
GTGCAACTGCGGCGCACGGCTTCGACAGCCTTCTGCTCCAAC TAGCAACACCAGCATTACCAGGTCAGCTAACGAGAACG
CGTATCTGGTCTAGATTTTATCTGATAGCGCTTATGCAAGCGCTAGCCAGACAATCCGTAGCTTTACAGCAGCTACGAT
TAGTTTTAATCAACTGACCTCAACCAGGCGTGGCTTTCAGTTAACCCGAAGCCGAATGTGCGTTTCAAGATCCGACGTT
CACAAAGTCTGCAATTCAGTTCGCTCGCATTTTGTGCGTCTTTCATCGACCCAGAGCCGAATGATCCACCGCAC
AGAGTGATTCATCGGTTTGCATTTTTCGGCTGCTGCTGGGCTGCTGTCTTGTGACGAGCGCGCCACAACATCAAGCCTC
AAATAGAATACCTTGATACAAATAACGCATTTCCGAAGAAATGCAGCGGGACGGCCAATTCGGTATATACCCACGACAG
ATGCGTTATCGTGATATAACCGCAACGACGCTCGTTGACGCTACTTTATACCTTTGGG

>Pdec_COI

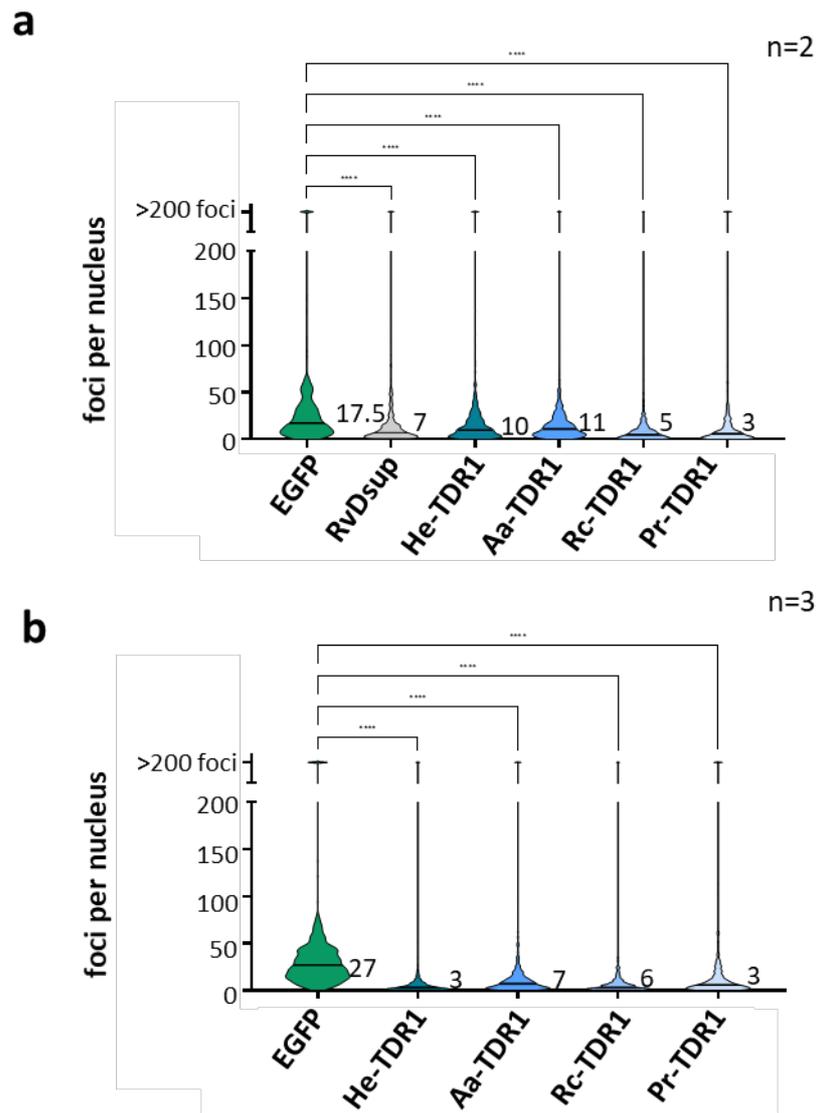
CTGCGATGATTTTTCTCTACAAACCACAAAGATATTGGGACTCTCTATTTTATTTTGGGCTTTGGGCAGCCACCATTGG
GACCTCTTTGAGATTTATTATCCGATCTGAATTAAGCCAACCTGGACAATGTTTGCAGACGAGCAATATTTAATGTTA
CAGTAACAAGACATGCCTTTGTTATAATTTCTTTTTTGTGATACCTATTCTTATTTGGGGGTTTGGTAACTGATTGGTC
CCCCCATAATTTGGGCTCCAGATATGGCTTTTCTCGAATAAACTTAAGATTTGACTCCTGCCTCCTTCTTTCT
TCTTATCCTTATGGGAACAATGCGAGAACAAGGGGCGGGTACTGGATGAACGTTTACCCGCCACTCTCCACTATTTT
CTCATAGCGGCCCTAGGGTTGACCTAACAAATTTTTCTCTTCATATCGCCGGAGCATCTTCTATTTTAGGAGCTATTAAT
TTTATTACTACAATTTAATAACGATCTTATCTATAAGAATAGAGCAAATACCTTTATTTGTATGGTCAGTGCTTAT
CACCGCTATTTTACTCTTTTAGCTCTACCCGTTTGTAGCTGGGCTATTACTATACTACTTCTAGACCGAAATTTAATA
CTTCTTTTTTTGACCCAGCAGGAGGGGGGACCTATTTTATACCAGCATCTGTTTTGATTCTTTGGCCACCCAGAGGTC
TACATTTCAATTTCTCCGGATTTGGTATTATTTCTCAAGTTATATCCACTTTAGAGGAAAGTCACTAACATTTGGACA
TTTGGGTATAATTTATGCAATAAGAACAATCGCCCTATTGGGATTTATTGTGTGAGCACACCATATGTTTACAGTAGGTA

TAGACTTAGATACCCGTGCATACTTTACAGCCGCCACTATAATTTATTGCCATTCCTACAGGTGTAAAAGTTTTTTAGATGA
CTAAGAACAATTTACGGAAGAAAAATTACATTTAGGGCCCCGATATGATGAGCCCTGGGATTTATTTTCCTTTTTACCCT
GGGAGGACTGACAGGGATTGTGTTATCAAATTCAGAATTGATATTTGCTCTCCATGATACTTACTACGTGGTCGCCACT
TTCACTACGTCCTGTCTATAGGAGCAGTTTTTGCATTTATTTGCGGGTAGCTCACTGATTCCCTCTTTTGTAGGGGTT
CAAATGAACAATAAATGACTCCAATCCCAGTTTTTGTATTATATTTATTGGGGTGAATATAACCTTTTTTCCCTCAACATTT
TCTAGGGTTGGCCGCATACCACGACGATATGTAGATTACCCAGACACCTTTTTTTCGTGGAACATGGCCTCTTCTTTTG
GGTCTTATTATCAGCACTCTCTGTTATTTTTCTTTTTTTTTATTCTATGAGAAGCAATTGTTTTCAACAGTTCAACGTAC
CCGGTGA

>Pdec_285

GGATAACTGGTTAATACCAGAACGACGATCAGTACATCTGATCGGAAACAGAAGTGAACGCAGTTCAAGAGCGCTCAGGA
TTACTTGTAGCGTGAAGTATATATCCTGACTCGATACGTGCTCGTTGGTATGGTATGCATTCCTCTCGATCGCTGACGG
GGTATGAATTGCGAGCCATCTGTGCCGCTGCGCCAGAAGGTAAGCACAAACCGCATATCGCTGTAAACCTGGCCAGCGCA
GTGAAGCTGGTGTCTAGGATACTGTGATGGTTTGTCTAACACTCCTACTGCGTCGAAAGTTGCAGCAGCGCTTACGCGC
TTACCGACCGATGTAGTACGTGGACAGGTACGCGTTTCTCGCTTGTATGCGTTGTGTAGCGTGCACAGCGGACAACGAT
GGAACAGTATCCGATAAAAATGTTCAATGATTGCTACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAA
GCCATGCATGTCTCAGTACTTGTATCACAAGCGAAACCGGAATGGCTCATTAATCAGTTATGGTTCACTAGATCGT
ACCGTTTACACGGATAACTGTGGTAATCTAGAGCTAATACGTGCAACCAGCTCGTTTCCCTCGTGAAGCGAGCGCAGTTA
TTAGAACAAGCAATCCGGCTTTCGGGTGCGTAACTTGGTACTCTGAATAACCGAAGCAGAGCGCATGGTCTCGTACC
GGCGCAGATCTTTCAAGTGTCTGACTTATCAGCTTGTGTTAGGTTATGTTCCTAACAAGGCTATTACGGGTGACGGGG
TATCAGGGTCCGATACCCGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCGCAAATTACCCA
CTCCCAGCACGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACGATGCGAGGGCTTTATGCCCTCAGCAATCGGAATGGGTACACTTTA
AATCCTTTAACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTA
AGTTGCTGCGTTTAAAAGCTCGTAGTTGAATCTGGGCAGTTGGACGGATGGTGCCTTACAGCGCTACTGTCTGCTCG
GCGCCACAAGCCGGCCATGTCTTGCATGCCCTTCACTGGGTGTCTTGGCGACCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATAGA
GTGCTCAAAGCAGGCGTACGGCCTTGATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTT
CGGAACGAGACTTAGCCTGCTAAATAGCAACTGATCCGACGCGTCACTTGTCTACAAAAGCTTCTTAGAGGGACAGGCG
CAAGACGAAGTACTGCGAAGGCATTTGCCAAGAATGTTTTCTAATAACAAGAAGGTTAGAGGTTGCAAGGCGATCA
GATACCGCCCTAGTTCTAACCAATAACGATGCCAACAGCGATCCGTCGGTGTATTATTTGATGACTCGACGGGCAGCTTC
CGGAAACCAAAGTGCTTAGGTTCCGGGGAAAGTATGGTTGCAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACAC
CAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACTTACCCGGCCCGGACACTGTAAGGATTGACAGATTG
AGAGCTCTTTCTGATTGCTGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGCTGTTAATTCGGATA
ACGAACGAGACTTAGCCTGCTAAATAGCCAACCTGATCCGACGCGTCACTTGTCTACAAAAGCTTCTTAGAGGGACAGGCG
GCGTTTAGTTCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGACGCGCGCTACTGAA
GGGAGCAACGTGCTTAATCACCTTGGCCGAAGGCTGGGGAATCCGATTAACCCCTTCTGATTGGGATTGAGCTTTG
TAATTATCGCTCATGAACGAGGAATCCAGTAAGCGCGAGTATAAGCTCGCTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACA
CACCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGCTTTCGGACTGGCCATCGAGGCTGCCGAAGGCGGCTTCG
TCTGGTTGGGAAGCAGCAAACTGGCTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCTGTAACAAGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGA
AGGATCATTAACGTGTAATCGGGCGGCGTGTGCTGTGCGCTAGGTCTTCCGGGCTGCGCGGCTCCGCTGCTGACGCG
ATAAGCGCTTCTAGCGCTTAACCTGAAAGTCGAGTCTACACGAACGGTGCATCGCTATCGTTACTATCCGGAGCGTTG
GTCAGCAATCGCAGCGTGTCTTGGCGACTGCCGGGTACGGTAGTGAACCTGGTAACTTCGGTACACCGTCCGATGTTGAT
TTACCTGTCCGAGCGTGAACGGGTGGTGCACACTGTAATGGCTGTGCCACGGGATACCTACCGTTCTACAAGACGATGCT
CTGCGGTGCTTGAATAACTCACGCGAGACCGTGGAGAGGCAATTCGCCGTAGAATGAGGGCCAGCAGCGCCCAAGGGTAT
AAAGTAGTGAACGAGCTGTTGCCGGTTATATCCAGATAACGCATCTGTCTGGGGTATATACCGAATTTGCCGCTC
CCGCTGCATTTCTTCCGAAATCGTTATTTGTATCAAGGTAATCTATTTGAGGCTTGATGTTGTGCGCGCTCGTACGA
AGACAGCAGCCAGCAGCAGCCGAAAAATGCAAAACCGATGAATCACTCTGTGCGGTGGATCATTCGGCTCGTGGGTCGAT
GAAGAACGCAGCAAAATGCGAGACGCGACGTGAATTCAGGACTTTGTGAACGTCGGATCTTCGAACGCACATTGCGGCT
TCGGGTTAACTGAAGCCACGCCGTTGGTGGGTCAGTTGATTTAAAATAATCGTAGCTGCGTGAAGCTACGGATTGTCT
GGTAGCGCTTGCATAAGGCGCTATCAGATGAAATCTAGACAGATACGCGTTCTCGTTAGCTGACCGGTAATGCTGGT
GTTGCTAGTTGGAGCAGAAGGCTGTGCAAGCCGTGCGCCGAGTTGCACGTGTATCGATTAGCTGCCAACGGCACTTCAG
TGGTTACAGCAAAAACAGAACACGTTCTGTGGGCTATCTGTGCCAATATGCGTTGAGCGGTGAACAGGTTCCCAATCTACGGA
GCAAGTAACTGTAGAACAGGGCCGTGAAGAATCACTTGGCTTCGCTACACTCATCTTTTGGCTCAGCTCAGACGAGA
TTACCCGCTGAAGTAAAGCATATTAAGCGGAGGAAAAAGAAACCAACGGGGATFCCCATAGTAACTGCGAGTGAAGG
GGAACAGCCAGCGCCGAATCTGTTGCTGGTAAACGGTGACAGGAACTGTGGCGTGAAGAAGGTGGTTACCGGTGTTGGCT
TGCTTGGCTAAGTTCTCTGAGTGAGGCTCCATCCATGGAGGTTGCAAGGCCGATCGTGAGCAGTTGATGCCGGTGT
ACATCTTCGGAGAGTCCCTTTGTTGTGAGTACAAGGTGAAGTCCGGTGGTAAACTCCATCGAAGGCTAAAATATGACCACG
AGTCCGATAGCGAACAAGTACCCTGAGGGAAAAATTGAAAAGCACTTTGAAGAGAGAGCGAAACAGTGCCTGAAACCGCTC
AGAGGCAAGCAGATGGGGCTCGAAGGCAAGCAGTGAATTCAGCCGGTGTGGTGGTGGCTGGTGGTGGTGGGATCGC
AAGACCCTAGCTGATTATGCTCGCGTGTGGCCGGTGCATTTTCCGCTGTTTGTACGCTCACCGCCGTTGAGCGAGCATCCG
TCGGGTATGCGTGTGAAGCCTTATTCCTTCCGGGCTAGGTGCTTACTGCTAACCTGTACGCTTTTGGCCCTCACTGGTC
ATGTCAGCGTGTGCCAGGTTAGCGTTGGGCCGGTATGCTCTGCGGTGTGTTGTGGATGACGAGCTTGTCTGGCTCCTC
GATACGAGTGGACTGCTTGGCGGTTTTCAACGTAGGCAATTTGTAGATTCCGGTGGCGAGTAGACGGCTGCCATCTAAC
CCGTCTTGWAAACCGGACCAAGGAGTTCAACATGCGCGCTAGTTGTTGGGACTTGAAGCCCGCTAGCAAAGTGAAGCAA
GACACAGTGTACGCTGTGATTTGGCGAGATCCCGTCACTGGTTTACCAGGCCGGGCGACCGCCGGCCCGTCAAAGCT
CATGTGGCTTTGGCGGAGCTTGGAGCTGCACGTTGAGACCCGAAAGATGGTGAACATGCCTGGGCAGGATGAAGCCAGG

GGAAACTCTGGTGGAGGTCCGTAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGACCTGGGTATAGGGCGAAAGACTAATC
GAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTCCGAAGTTCCCTCAGGATAGCTGGCACTCGAGAGAACGTAGTCTCTCCCGTAAA
GCGAATGATTAGTGGCCTTGGGGTCGAAACGACCTTAACCAATTCTCAAACTTTAAATGGGTGAGAAGTCCGGCTTGCTT
AAATGCATAGCTGAAGTCCGGACGTTGGATACGAGCGCCTAGTGGGCCACTTTTGGTAAGCAGAACTGGCGCTGTGGGAT
GAACCGAACGCTGAGTTATGGCGCCCGACGAGACGCTCATCAGATCCCAGAAAAGGTGTTGGTTGCTATAGACAGCAGGA
CGGTGGCCATGGAAGTCGGAACCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAAGCAACTAGCCCTGAAAATGGATGG
CGCTAGAGCGTCTGGCCTATACTCGGCCGTTGCAGCAGCAGCAACGTTAAGTCAAGCTGCAACGAGTAG



Supp Figure 9. Independent replicate of experiments of Figure 6.

Supp Table 1: First 100 most significant differentially expressed genes in *H.exemplaris* (IR vs Ctrl)

GeneID	baseMean	log2FoldChange	padj	Hsap_BH	Name on graph	putative Tardigrade specific gene
Hexe_geneID_BV898_18082	216120,1	8,10	0,0E+00	LIG1	LIG1	NA
Hexe_geneID_BV898_01166	222704,8	8,73	0,0E+00	XRCC5	XRCC5	NA
Hexe_geneID_BV898_08059	46670,7	6,71	1,4E-241	PARP2	PARP2	NA
Hexe_geneID_BV898_18536	22589,2	5,33	1,5E-239	LIG4	LIG4	NA
Hexe_geneID_BV898_07590	131886,0	7,29	1,0E-212	PARP3	PARP3	NA
Hexe_geneID_BV898_07145	5553,5	6,54	8,6E-211	XRCC6	XRCC6	NA
Hexe_geneID_BV898_02637	32183,1	6,57	7,8E-208	TK2	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_14257	33930,8	7,94	2,1E-202	NA	TDR1	Tardi
Hexe_geneID_BV898_17031	10453,2	7,00	2,3E-191	BCS1L	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_14774	43750,1	7,18	2,1E-186	PNKP	PNKP	NA
Hexe_geneID_BV898_13167	9899,4	5,65	1,0E-180	XRCC6	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_09437	19394,3	6,56	1,2E-175	PCNA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_10478	56563,5	7,26	2,3E-168	MACROH2A1	MACROH2A1	NA
Hexe_geneID_BV898_12022	17855,5	5,64	1,5E-164	POLQ	POLQ	NA
Hexe_geneID_BV898_16499	1493,9	7,24	6,0E-161	ADAMTS10	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_17036	1605,2	5,09	6,0E-158	BCS1L	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_16497	8634,7	6,48	8,9E-156	RNF146	RNF146	NA
Hexe_geneID_BV898_09662	4112,8	6,67	1,1E-152	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_06932	4468,9	6,60	1,5E-140	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_01286	18285,0	5,31	4,8E-135	NAPRT	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_03941	4747,1	6,76	3,9E-122	H3-3A	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_08674	1226,1	4,92	2,5E-121	IGFALS	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_06221	7782,5	5,06	9,2E-110	RRM2	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_00321	10226,4	5,14	1,8E-103	RAD51	RAD51	NA
Hexe_geneID_BV898_10457	21764,7	14,82	1,1E-92	NA	DDR1	Tardi
Hexe_geneID_BV898_04045	6052,0	4,72	8,7E-92	DCUN1D4	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_10564	968,3	8,24	1,0E-88	PPM1B	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_10406	15830,3	4,09	7,6E-85	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_02009	2449,5	4,61	2,5E-80	BCS1L	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_13865	969,8	5,50	3,4E-80	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_05933	3979,1	3,66	1,8E-79	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_02636	17993,6	3,54	8,4E-79	EIF5B	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_15820	883,2	8,42	1,2E-76	PRSS36	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_05956	11851,5	5,53	3,5E-72	BARD1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_02010	3836,7	4,37	9,4E-71	BCS1L	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_11662	19054,1	5,07	7,7E-70	XRCC1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_11453	9900,2	4,77	8,0E-70	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_09370	1932,1	3,10	2,1E-69	KIF3B	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_12881	8432,2	3,64	1,1E-65	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_05766	805,0	9,22	4,5E-63	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_17839	1261,7	4,98	2,1E-62	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_16700	3902,5	3,00	1,6E-61	TTC14	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_10264	18273,2	3,75	1,1E-60	NA	AMNP	Tardi
Hexe_geneID_BV898_20143	1442,2	5,41	1,9E-60	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_09594	13827,1	3,62	2,1E-60	SLC6A7	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_11349	762,1	3,31	3,2E-60	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_03002	301,6	5,81	1,2E-57	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_06508	3906,2	3,47	1,1E-56	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_06951	8593,5	3,14	1,1E-56	EIF2B5	NA	NA

Hexe_geneID_BV898_06497	4995,9	2,61	1,0E-54	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_12244	321,2	4,00	3,0E-53	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_03839	763,5	3,33	2,3E-52	PDRG1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_15239	30122,8	3,19	5,3E-52	TXN	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_06112	9349,6	3,94	1,6E-51	GADD45A	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_10530	7496,9	3,49	2,2E-51	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_07406	1335,5	3,20	5,0E-51	ERI1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_13869	292,1	5,37	3,1E-50	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_00230	11566,7	3,14	2,7E-49	ABLIM3	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_18922	569,9	4,56	1,5E-48	TMEM151B	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_18081	2647,8	2,93	1,7E-48	FAM126A	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_09371	838,3	3,07	2,7E-48	TERT	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_03840	193,8	4,82	6,2E-48	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_14258	5145,5	2,28	8,8E-48	SHOC2	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_05048	5565,9	3,24	9,9E-48	SBNO2	SBNO2	NA
Hexe_geneID_BV898_14775	1651,5	4,68	1,7E-46	NDUFAF6	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_13643	7407,2	2,67	2,4E-46	PRPF39	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_12027	31134,4	2,09	3,6E-46	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_15819	1281,8	4,07	6,7E-46	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_13877	429,4	6,13	6,2E-45	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_13871	307,9	5,15	1,7E-44	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_03203	1850,2	4,04	3,0E-44	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_08057	180,0	5,34	2,2E-43	PARP2	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_18698	244,0	6,57	4,2E-43	BCS1L	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_13872	238,9	4,51	8,8E-41	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_12245	9622,8	3,74	2,0E-40	NOS1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_14864	1381,7	3,51	2,4E-40	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_08291	1272,6	2,51	2,6E-40	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_18954	3454,2	3,13	1,8E-39	ABCC10	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_03659	1699,0	3,96	7,1E-38	APOD	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_01623	2090,9	3,14	8,2E-38	LENG9	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_08860	1033,2	3,43	2,4E-37	TRPT1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_08121	1988,8	2,59	3,5E-37	GOLT1B	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_19153	794,6	6,35	7,8E-37	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_10678	429,9	4,85	3,0E-36	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_03022	2924,9	3,61	1,2E-35	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_19152	908,7	6,50	2,5E-35	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_05795	127,5	4,37	9,2E-35	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_03259	20890,3	2,99	1,4E-34	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_01539	11414,0	2,65	1,7E-34	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_07716	769,8	2,70	8,6E-34	SNAPC1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_07835	1800,2	2,03	3,6E-33	HDHD2	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_12219	765,5	5,72	6,8E-33	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_04104	423,3	3,65	9,8E-33	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_06986	236,2	-2,79	1,5E-32	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_13895	1592,3	2,87	6,2E-32	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_03841	113,3	4,87	8,8E-32	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_05953	172,4	4,91	1,0E-31	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_09099	920,1	-2,10	1,1E-31	MEP1B	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_11357	3292,2	1,95	1,7E-31	SLC30A2	NA	NA

Supp Table 2: First 100 most significant differentially expressed genes in *P.fairbanksi* (IR vs Ctrl)

GeneID	baseMean	log2Fold Change	padj	Hsap_BHx	Name on graph	Tardi_Pfai	Hexe_GeneID_BH	Aant_GeneID_BH
Pfai_geneID_00161	49921,2	7,5	0,0E+00	MYH7	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01166	NA
Pfai_geneID_02481	18628,9	4,2	0,0E+00	NUP50	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08184	NA
Pfai_geneID_05434	118796,0	6,5	0,0E+00	PARP3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07590	NA
Pfai_geneID_02525	82396,7	6,1	2,1E-279	MACROH2A1	MACROH2A1	NA	Hexe_geneID_BV898_10478	NA
Pfai_geneID_02614	73499,5	6,3	1,4E-242	PNKP	PNKP	NA	Hexe_geneID_BV898_14774	NA
Pfai_geneID_01190	10448,8	5,7	8,5E-237	SMARCAD1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10412	NA
Pfai_geneID_00554	5191,8	4,7	3,5E-234	PRPF19	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00972	NA
Pfai_geneID_03633	14802,4	6,4	2,3E-233	MACROH2A1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10478	NA
Pfai_geneID_41464	99236,4	10,9	6,0E-227	HMGB3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09620	NA
Pfai_geneID_60778	3617,9	5,7	8,5E-226	RPA2	RPA2	NA	Hexe_geneID_BV898_02372	NA
Pfai_geneID_04948	32373,9	6,3	1,6E-224	NAPRT	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01286	NA
Pfai_geneID_26337	2230,0	5,4	5,0E-218	LIG1	LIG1	NA	Hexe_geneID_BV898_18082	NA
Pfai_geneID_00791	7594,7	5,3	4,8E-210	TDP2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04866	NA
Pfai_geneID_02210	2667,5	6,8	3,1E-209	RRM2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06221	NA
Pfai_geneID_05525	43492,0	6,7	6,3E-207	XRCC6	XRCC6	NA	Hexe_geneID_BV898_13167	NA
Pfai_geneID_49423	1919,6	6,1	6,3E-201	PRPF19	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00972	NA
Pfai_geneID_52906	22732,3	5,8	8,6E-199	UNG	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17296	NA
Pfai_geneID_63518	41361,6	8,2	2,5E-198	CHEK2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07560	NA
Pfai_geneID_72730	1327,1	6,5	3,8E-183	H33A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07478	NA
Pfai_geneID_60987	2537,5	5,4	7,8E-183	MACROH2A1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10478	NA
Pfai_geneID_08992	4654,3	4,7	3,6E-180	LIG4	LIG4	NA	Hexe_geneID_BV898_18536	NA
Pfai_geneID_00164	2887,0	8,4	5,1E-172	MYH7	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18762	NA
Pfai_geneID_65628	1597,1	2,6	2,0E-171	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_04970
Pfai_geneID_12683	4777,7	5,7	1,2E-160	PRPF19	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00972	NA
Pfai_geneID_00468	3968,1	5,3	5,4E-160	POLQ	POLQ	NA	Hexe_geneID_BV898_12022	NA
Pfai_geneID_01297	1354,2	7,1	9,8E-157	FANCM	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17966	NA
Pfai_geneID_26751	1877,3	9,0	4,6E-144	PARP3	PARP3	NA	Hexe_geneID_BV898_07590	NA
Pfai_geneID_50862	2349,7	4,0	1,6E-143	SUB1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_16384	NA
Pfai_geneID_02102	1005,8	7,1	2,9E-140	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_11725	NA
Pfai_geneID_31040	4293,2	5,0	2,7E-139	XRCC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11662	NA
Pfai_geneID_15712	175780,3	5,6	8,3E-138	BCS1L	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13185	NA
Pfai_geneID_22578	71216,4	5,5	4,7E-136	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_04586	NA
Pfai_geneID_21558	792,9	4,5	5,8E-128	LSM14B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09752	NA
Pfai_geneID_30175	976,6	4,4	1,6E-127	MACROH2A1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10478	NA
Pfai_geneID_05565	364,8	3,8	8,0E-127	UBA1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_03325	NA

Pfai_geneID_13471	1481,6	3,6	8,0E-127	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_12013	NA
Pfai_geneID_46989	15240,9	2,9	8,3E-127	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_05814	NA
Pfai_geneID_58294	419,3	4,5	5,5E-124	RPA2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02372	NA
Pfai_geneID_42546	25952,6	6,2	7,7E-118	TK2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02637	NA
Pfai_geneID_78766	3254,6	8,4	2,5E-117	NA	NA	Tardi	NA	NA
Pfai_geneID_35597	4405,3	4,9	4,4E-115	XRCC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11662	NA
Pfai_geneID_57107	2483,5	4,6	5,6E-114	RCE1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02302	NA
Pfai_geneID_30592	2029,5	3,4	6,9E-114	RPA1	RPA1	NA	Hexe_geneID_BV898_09830	NA
Pfai_geneID_49818	944,2	5,9	3,2E-113	UNG	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17296	NA
Pfai_geneID_33091	567,1	5,3	6,7E-111	XRCC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11662	NA
Pfai_geneID_24577	12052,8	5,3	8,7E-110	LIG1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18082	NA
Pfai_geneID_50016	4914,5	5,2	2,2E-109	CBX6	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07002	NA
Pfai_geneID_43859	18384,9	6,3	3,4E-108	TK2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02637	NA
Pfai_geneID_07429	1137,8	4,4	4,1E-107	NLGN3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_14418	NA
Pfai_geneID_00069	1383,0	3,3	9,6E-107	USP34	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13570	NA
Pfai_geneID_21557	404,4	4,5	1,9E-105	NOLC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05605	NA
Pfai_geneID_62527	428,2	4,5	5,9E-104	SUMO1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00738	NA
Pfai_geneID_46659	1411,2	6,5	1,1E-103	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_04036	NA
Pfai_geneID_44641	980,2	5,5	3,6E-101	KBTBD8	NA	NA	NA	Aant_geneID_12044
Pfai_geneID_03884	3053,3	4,2	8,2E-101	SMC5	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05719	NA
Pfai_geneID_19012	1739,0	7,4	1,3E-100	NAPRT	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01286	NA
Pfai_geneID_39386	821,4	4,9	2,1E-99	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_00826
Pfai_geneID_53377	930,0	3,1	8,7E-99	BTBD3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01638	NA
Pfai_geneID_21076	955,6	4,3	1,9E-98	TDP2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04866	NA
Pfai_geneID_42796	55628,5	3,5	6,0E-98	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_05814	NA
Pfai_geneID_29131	1342,4	3,1	2,4E-97	MINDY2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05993	NA
Pfai_geneID_53434	1550,9	3,9	5,7E-96	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_32489
Pfai_geneID_04249	356,1	5,0	9,6E-96	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_11800
Pfai_geneID_54600	4413,3	5,4	2,2E-94	RPA2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02372	NA
Pfai_geneID_57628	39956,5	2,6	2,5E-94	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_10309	NA
Pfai_geneID_55125	1980,2	3,8	4,8E-94	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_10509
Pfai_geneID_31293	362,1	4,4	2,1E-93	RAD54L	RAD54	NA	Hexe_geneID_BV898_07392	NA
Pfai_geneID_31535	1770,8	3,4	1,6E-92	RPA1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09830	NA
Pfai_geneID_30202	3095,0	5,0	1,7E-92	MRE11	MRE11	NA	Hexe_geneID_BV898_01799	NA
Pfai_geneID_55310	1264,1	4,6	2,8E-91	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_16604
Pfai_geneID_01020	1548,5	3,7	8,3E-91	ABCB1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13682	NA
Pfai_geneID_08056	7894,3	2,7	4,7E-90	CYP2J2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00591	NA
Pfai_geneID_80174	24470,2	8,5	1,5E-89	NA	NA	Tardi	NA	NA
Pfai_geneID_16208	698,9	-2,8	1,2E-87	PURA	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_15513	NA
Pfai_geneID_01443	1419,4	3,5	1,6E-87	RRM1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01538	NA
Pfai_geneID_52850	830,2	4,1	4,4E-87	ELOVL2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_14386	NA

Pfai_geneID_30192	1923,0	2,8	1,3E-85	STK11	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12954	NA
Pfai_geneID_07913	970,1	6,1	1,4E-85	TDP2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04866	NA
Pfai_geneID_10021	2405,5	3,5	2,0E-85	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_12013	NA
Pfai_geneID_33351	737,3	3,0	3,1E-85	RAD51	RAD51	NA	Hexe_geneID_BV898_00321	NA
Pfai_geneID_43377	1046,5	9,4	2,5E-83	NA	NA	Tardi	NA	NA
Pfai_geneID_00882	2835,3	5,5	1,5E-82	ATR	ATR	NA	Hexe_geneID_BV898_08877	NA
Pfai_geneID_07671	1118,8	4,3	1,8E-81	PRDX6	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18618	NA
Pfai_geneID_47313	57226,7	2,6	1,6E-80	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_05814	NA
Pfai_geneID_71072	28628,8	5,2	6,6E-80	H33A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07478	NA
Pfai_geneID_32535	412,1	6,0	7,0E-80	UNG	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17296	NA
Pfai_geneID_37407	271,5	5,1	1,3E-79	SND1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06645	NA
Pfai_geneID_20051	7320,1	4,4	1,5E-79	SUB1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_16384	NA
Pfai_geneID_01137	1876,8	3,0	7,9E-79	SHPRH	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10690	NA
Pfai_geneID_46610	1229,2	4,5	8,2E-79	NA	NA	Tardi	NA	NA
Pfai_geneID_47008	942,4	7,5	1,0E-78	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_14810
Pfai_geneID_12963	50663,2	4,4	2,9E-77	GTPBP10	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_20059	NA
Pfai_geneID_52230	1423,7	5,4	4,9E-76	H3C13	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01614	NA
Pfai_geneID_55033	4688,0	3,7	3,3E-75	NA	NA	Tardi	NA	Aant_geneID_02119
Pfai_geneID_79528	1747,7	2,5	4,4E-75	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_07798	NA
Pfai_geneID_42979	458,3	4,7	5,4E-75	CASP10	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11959	NA
Pfai_geneID_09201	4603,3	3,9	2,3E-74	DNA2	DNA2	NA	Hexe_geneID_BV898_09864	NA
Pfai_geneID_28249	1391,4	2,9	4,8E-74	COQ8A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_03787	NA
Pfai_geneID_00094	2966,65	3,31	8E-74	USP34	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13570	NA

Supp Table 3: First 100 most significant differentially expressed genes in *A.antacticus* (IR vs Ctrl)

GeneID	baseMean	log2FoldChange	padj	Hsap_BHx	Name on graph	putative Tardigrade specific gene	Hexe_GeneID
Aant_geneID_28326	4894,9	5,92	0,0E+00	RAD51	RAD51	NA	Hexe_geneID_BV898_00321
Aant_geneID_37213	28782,4	4,74	0,0E+00	H2BC13	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01753
Aant_geneID_33900	4726,9	5,98	1,2E-249	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_10619
Aant_geneID_34075	3089,5	8,68	1,7E-227	NA	TDR1	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14257
Aant_geneID_38343	8475,5	4,93	1,8E-218	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_10619
Aant_geneID_33068	2338,9	5,12	1,1E-207	RNF146	RNF146	NA	Hexe_geneID_BV898_16497
Aant_geneID_34872	5311,7	4,09	1,2E-196	PITHD1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05722
Aant_geneID_38326	2792,4	3,89	4,1E-191	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_15772	11458,0	6,62	1,3E-185	LIG1	LIG1	NA	Hexe_geneID_BV898_18082
Aant_geneID_23080	1462,4	6,99	6,1E-181	EXO5	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08148
Aant_geneID_04489	2002,9	4,50	5,0E-180	RAD50	RAD50	NA	Hexe_geneID_BV898_09974
Aant_geneID_17815	1835,0	5,09	2,7E-176	MRE11	MRE11	NA	Hexe_geneID_BV898_01799
Aant_geneID_17825	3416,8	5,10	4,2E-174	POLL	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09905
Aant_geneID_34997	10046,2	6,45	7,0E-174	TRPT1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08860
Aant_geneID_01745	2377,5	4,88	2,4E-173	SBNO1	SBNO1	NA	Hexe_geneID_BV898_05048
Aant_geneID_29485	2417,9	5,27	1,8E-172	MGMT	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12449
Aant_geneID_08289	2201,5	4,23	6,7E-155	XRCC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11662
Aant_geneID_34222	2031,0	3,80	1,2E-153	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_09622
Aant_geneID_21686	4522,6	3,33	4,6E-149	FAF2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13413
Aant_geneID_38826	4624,8	3,50	2,7E-141	H2AX	H2AX	NA	Hexe_geneID_BV898_01616
Aant_geneID_24333	23761,1	5,96	1,0E-138	BCS1L	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12811
Aant_geneID_30525	936,6	5,11	1,6E-133	FUT3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01632
Aant_geneID_16820	1839,9	5,23	2,2E-131	XRCC6	XRCC6	NA	Hexe_geneID_BV898_13167
Aant_geneID_31228	761,3	5,66	3,0E-129	RRM2B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06221
Aant_geneID_26370	23742,6	7,15	1,6E-123	PNKP	PNKP	NA	Hexe_geneID_BV898_14774
Aant_geneID_17044	27773,3	5,42	2,1E-121	SELENOO	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_03891
Aant_geneID_30154	2336,1	4,34	2,2E-121	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_09858
Aant_geneID_28654	1920,1	5,50	2,3E-120	RRM2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06221
Aant_geneID_32587	7709,0	5,77	2,0E-118	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_34878	2827,8	3,03	2,7E-116	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_03892
Aant_geneID_33328	818,4	6,77	2,5E-110	NDUFB8	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01167
Aant_geneID_18198	3273,6	6,81	7,8E-109	LIG1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18082
Aant_geneID_11585	1507,0	3,68	8,1E-107	RNF14	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07718
Aant_geneID_13060	6165,8	7,14	1,8E-105	RPL35	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00635
Aant_geneID_27158	2713,0	5,23	2,7E-104	RRM2B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06221

Aant_geneID_17090	1142,0	3,27	7,5E-103	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_05274
Aant_geneID_32635	3009,9	3,18	1,1E-101	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_06110
Aant_geneID_28464	1847,2	7,62	3,9E-96	H3C13	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_16478
Aant_geneID_00329	791,0	4,57	3,2E-95	FANCM	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17966
Aant_geneID_13906	2475,6	5,22	2,4E-94	PARP2	PARP2	NA	Hexe_geneID_BV898_08059
Aant_geneID_15705	923,1	4,89	2,8E-92	ARIH1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07414
Aant_geneID_13418	18074,2	7,74	9,9E-91	XRCC5	XRCC5	NA	Hexe_geneID_BV898_01166
Aant_geneID_14122	535,7	4,92	1,2E-90	PARP2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08059
Aant_geneID_35876	997,5	4,75	1,2E-88	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_01752	12508,5	7,87	2,0E-88	PARP3	PARP3	NA	Hexe_geneID_BV898_07590
Aant_geneID_14818	2381,4	3,13	5,8E-87	DDX23	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09760
Aant_geneID_05739	1851,7	3,72	1,1E-86	PCK1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04654
Aant_geneID_12145	1007,8	4,24	9,2E-85	LIG4	LIG4	NA	Hexe_geneID_BV898_18536
Aant_geneID_10990	15706,5	7,54	7,0E-83	XRCC5	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01166
Aant_geneID_30735	853,3	6,22	5,5E-76	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_00985	5542,9	3,34	2,1E-75	RIOK3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04027
Aant_geneID_03103	2046,3	7,98	6,7E-74	CSNK2B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_03942
Aant_geneID_18944	1243,8	10,09	7,1E-74	TK2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02637
Aant_geneID_32833	801,9	3,50	1,4E-73	DTYMK	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_15086
Aant_geneID_37336	576,4	5,70	4,3E-73	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_31872	1970,8	2,77	1,2E-72	GCLM	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12892
Aant_geneID_19829	4464,5	7,07	7,3E-72	LIG1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18082
Aant_geneID_27751	806,9	3,71	8,9E-70	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_05927
Aant_geneID_00835	523,2	7,53	1,6E-68	RPS2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10615
Aant_geneID_22892	335,1	5,02	8,2E-68	POLL	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09905
Aant_geneID_06212	1636,2	5,28	8,5E-68	XRCC6	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13167
Aant_geneID_04058	1124,7	5,45	7,5E-64	TK2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05149
Aant_geneID_28512	1496,6	2,00	3,7E-63	ZNF622	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05746
Aant_geneID_14171	377,1	5,33	6,7E-63	RAD54L	RAD54	NA	Hexe_geneID_BV898_07392
Aant_geneID_30119	508,4	3,20	1,8E-61	DCUN1D4	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04045
Aant_geneID_36430	2775,7	2,90	3,8E-61	POLD4	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18581
Aant_geneID_12291	483,2	3,02	1,4E-60	DDX23	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09760
Aant_geneID_06679	1400,9	3,84	4,0E-60	ERCC6	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02473
Aant_geneID_16030	3052,8	2,71	6,9E-59	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_07384
Aant_geneID_08201	1056,9	3,15	1,1E-57	TBXAS1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11786
Aant_geneID_28397	7700,4	1,69	1,3E-57	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_06284
Aant_geneID_13983	384,3	7,81	1,9E-57	XRCC5	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01166
Aant_geneID_11493	2395,9	2,17	2,6E-55	WDR45	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_15952
Aant_geneID_30943	1315,4	2,76	1,5E-54	SLC25A46	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12636
Aant_geneID_07873	194,2	4,14	7,9E-54	ERG28	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10086
Aant_geneID_32354	4657,5	3,33	4,0E-52	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_01580

Aant_geneID_24093	1707,1	1,69	4,7E-52	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14004
Aant_geneID_22917	525,0	3,52	2,5E-51	SOCS6	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02659
Aant_geneID_28102	1912,4	3,16	1,1E-50	JOSD2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11384
Aant_geneID_34101	1543,7	1,81	3,5E-50	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_00927
Aant_geneID_06849	359,8	3,51	1,9E-48	PCK1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04654
Aant_geneID_23769	3341,1	2,11	3,3E-48	CTBS	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18096
Aant_geneID_25330	197,2	6,51	5,9E-48	PGGT1B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10620
Aant_geneID_09650	763,9	2,39	9,4E-48	DIS3L2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10638
Aant_geneID_04428	370,1	3,91	1,2E-46	PCK1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04654
Aant_geneID_40208	276,9	7,22	3,3E-46	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_00644
Aant_geneID_10850	262,3	3,54	6,0E-45	SELENOO	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_03891
Aant_geneID_30000	183,9	5,79	8,8E-45	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_16793	39891,4	1,38	1,1E-44	HSP90AAA1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05798
Aant_geneID_12843	1036,4	2,36	1,3E-44	RFC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01929
Aant_geneID_01757	6094,7	6,31	3,7E-44	PARP3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07590
Aant_geneID_38250	153,2	5,57	5,5E-44	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_33541	1756,3	1,74	7,5E-44	UBE2A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12627
Aant_geneID_02600	1144,3	2,46	1,5E-43	ATP13A3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_15790
Aant_geneID_37275	2145,8	2,45	3,3E-43	ELOC	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17028
Aant_geneID_18559	201,7	6,84	3,3E-42	YIF1B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_15766
Aant_geneID_33316	247,4	3,83	3,8E-42	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_17634
Aant_geneID_32258	990,4	2,21	4,3E-42	CRYZ	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06375
Aant_geneID_18762	1071,6	3,38	5,2E-42	CHAF1A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05912

Supp Table 4: First 100 most significant differentially expressed genes in *H.exemplaris* (Bleomycin vs Ctrl)

GeneID	baseMean	log2FoldChang e	padj	Hsap_RBH	Name	Tardi
Hexe_geneID_BV898_18082	31833,5	5,2	0	LIG1	LIG1	NA
Hexe_geneID_BV898_10478	13462,6	5,1	2,368E-297	MACROH2A1	MACROH2A1	NA
Hexe_geneID_BV898_01166	35346,8	5,5	5,8596E-275	XRCC5	XRCC5	NA
Hexe_geneID_BV898_11662	9765,3	3,8	4,3497E-258	XRCC1	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_14774	5188,0	4,6	3,1264E-241	PNKP	PNKP	NA
Hexe_geneID_BV898_07590	18397,3	3,7	3,5561E-194	PARP3	PARP3	NA
Hexe_geneID_BV898_10457	7635,8	10,8	7,3304E-183	NA	DDR1	Tardi
Hexe_geneID_BV898_14257	3783,6	4,0	2,7968E-179	NA	TDR1	Tardi
Hexe_geneID_BV898_15545	953,5	6,1	4,4123E-167	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_08059	11915,2	4,7	1,6254E-154	PARP2	PARP2	NA
Hexe_geneID_BV898_03941	1907,0	5,0	7,1569E-148	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_04948	17986,0	7,2	3,0305E-143	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_09437	4015,8	4,5	9,2331E-133	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_16497	2359,2	4,6	1,0771E-131	RNF146	RNF146	NA
Hexe_geneID_BV898_05766	1914,5	9,1	1,5024E-129	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_16683	4276,3	4,2	7,0119E-129	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_07145	1620,3	4,5	3,0176E-120	NA	XRCC6	NA
Hexe_geneID_BV898_18536	6071,9	3,1	6,2757E-114	LIG4	LIG4	NA
Hexe_geneID_BV898_14014	2632,5	3,5	1,0131E-110	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_15239	13099,7	2,3	8,8534E-109	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_06932	1136,9	4,8	3,2887E-106	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_19152	585,7	5,4	2,5727E-105	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_14751	6130,2	2,7	4,3607E-100	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_04740	859,6	7,0	2,11671E-92	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_02637	6352,2	3,7	2,09485E-87	TK2	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_12219	373,3	4,7	1,13509E-86	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_19153	509,8	5,7	1,43736E-85	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_17031	2345,4	4,9	6,68313E-85	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_09662	1645,1	4,7	3,13637E-84	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_13167	2760,4	3,5	5,13625E-75	XRCC6	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_14191	419,6	-3,1	1,99024E-72	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_11236	1268,4	4,5	6,11461E-69	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_04045	1661,6	2,5	1,91986E-66	DCUN1D4	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_06221	2306,1	3,4	4,01865E-64	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_12245	6803,0	2,7	2,19497E-61	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_01286	4224,2	2,8	2,07811E-60	NAPRT	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_20143	519,7	3,1	7,39656E-58	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_13865	505,2	4,3	8,19388E-57	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_02010	1193,8	2,9	1,74346E-55	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_00321	4700,3	3,2	7,664E-53	RAD51	RAD51	NA
Hexe_geneID_BV898_03400	11305,9	4,2	8,19757E-52	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_02009	689,3	2,9	4,64651E-49	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_14063	272,4	6,8	1,66977E-47	CFAP52	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_05956	3963,0	3,4	1,64912E-46	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_03002	185,0	5,3	8,99875E-46	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_12022	7783,9	4,1	1,04309E-44	POLQ	POLQ	NA
Hexe_geneID_BV898_00680	2550,4	2,8	1,63787E-43	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_11453	2625,0	2,8	2,30936E-43	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_03452	310,4	-3,7	7,99843E-43	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_01686	452,3	3,0	2,17417E-41	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_15820	229,2	6,9	3,04635E-40	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_11237	1446,1	3,2	1,04489E-39	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_13871	143,7	3,9	4,61265E-39	NA	NA	Tardi
Hexe_geneID_BV898_17036	520,3	2,7	1,09886E-38	NA	NA	NA
Hexe_geneID_BV898_13869	147,8	3,9	2,95848E-38	NA	NA	Tardi

Hexe_genelD_BV898_07775	946,5	-2,2	6,88752E-38	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_06264	8264,5	3,5	1,69095E-37	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_08674	406,1	3,2	2,98977E-37	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_17839	268,7	3,0	1,54759E-36	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_14190	918,8	-3,7	7,22143E-36	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_12244	169,8	3,1	3,80451E-35	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_14775	297,3	2,6	2,15707E-34	NDUFAF6	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_03888	423,8	-4,0	3,01743E-34	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_07972	137,2	4,4	9,6818E-34	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_03086	981,5	-1,6	1,27274E-33	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_10564	172,2	4,9	2,61335E-32	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_10912	180,4	5,4	2,99496E-32	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_08612	97,8	-4,1	3,60844E-32	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_02916	1099,0	3,8	6,04445E-32	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_03914	3092,3	4,3	3,68151E-31	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_06994	2106,1	3,4	1,01911E-28	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_16499	93,0	3,8	3,58726E-28	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_08265	428,2	3,2	4,1093E-28	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_03212	1209,1	-1,7	1,63375E-27	MTARC1	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_00016	802,6	-3,6	1,80196E-27	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_05719	1598,2	1,7	1,9421E-27	SMC5	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_18687	3250,0	-2,6	3,45233E-27	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_02424	115,0	-3,5	6,41252E-27	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_07523	240,8	-1,9	9,87027E-27	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_06377	7545,7	-2,6	1,1094E-26	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_01554	634,8	-2,6	2,26918E-26	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_13877	101,5	3,1	3,35841E-26	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_10656	213,9	2,2	3,6856E-26	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_16682	2405,1	2,9	4,40904E-26	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_12248	1473,2	1,6	5,5165E-26	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_18457	2872,1	-1,1	6,86769E-26	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_03394	215,6	4,9	7,34332E-26	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_13872	129,0	3,6	1,32948E-25	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_06447	830,9	-2,3	1,35914E-25	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_18922	132,5	2,4	1,56962E-25	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_12883	524,6	1,8	1,5753E-25	C9orf85	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_10261	3676,5	2,1	1,72338E-25	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_12856	2364,9	-2,2	1,98735E-25	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_13814	737,5	1,3	3,46644E-25	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_06925	237,8	2,9	3,54686E-25	NA	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_05048	3784,3	2,2	6,77258E-25	SBNO2	SBNO2	NA
Hexe_genelD_BV898_00510	624,9	-3,5	2,98473E-24	NA	NA	Tardi
Hexe_genelD_BV898_15183	135,5	-2,5	3,004E-24	RORB	NA	NA
Hexe_genelD_BV898_02093	103,26114	3,26936793	5,0971E-24	NA	NA	Tardi

Supp Table 5: First 100 most significant differentially expressed genes in *A.acutuncus* (*Bleomycin vs Ctrl*)

GeneID	baseMean	log2FoldChange	padj	Hsap_BHx	Name on graph	putative Tardigrade specific	Hexe_GeneID
Aant_geneID_38523	13807,7	4,2	9,5E-41	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_29485	920,8	3,6	7,6E-30	MGMT	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12449
Aant_geneID_29872	862,7	4,1	1,0E-26	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_09789
Aant_geneID_24333	4219,0	3,3	1,2E-21	BCS1L	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12811
Aant_geneID_39673	25767,8	3,9	1,6E-20	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_28326	1220,5	3,9	4,7E-20	RAD51	RAD51	NA	Hexe_geneID_BV898_00321
Aant_geneID_22540	933,8	-10,6	2,2E-19	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_31705	5866,9	-9,7	5,3E-19	ACTB	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_02877
Aant_geneID_04821	880,4	-4,7	1,1E-18	TMPRSS4	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04490
Aant_geneID_04097	705,1	-1,9	2,2E-18	SHPK	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_16557
Aant_geneID_31898	611,8	-3,8	2,2E-18	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_04643
Aant_geneID_23080	507,9	5,0	2,5E-18	EXO5	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08148
Aant_geneID_08773	626,1	-10,0	3,5E-17	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_39805	2823,7	3,9	6,3E-17	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_13060	644,2	3,9	8,4E-16	RPL35	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00635
Aant_geneID_23209	1795,8	-1,6	2,0E-14	VPS33A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08839
Aant_geneID_36112	678,3	-8,8	2,0E-14	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_38738	588,7	-7,3	3,7E-14	ARF1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_03185
Aant_geneID_26970	2927,4	4,4	1,1E-13	MACROH2A1	MACROH2A1	NA	Hexe_geneID_BV898_10478
Aant_geneID_37541	592,1	-10,9	1,7E-13	ODC1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_12605
Aant_geneID_37265	688,7	-11,2	4,8E-13	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_37702	721,2	-2,4	6,3E-13	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_37213	5668,6	2,0	7,4E-13	H2BC13	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_01753
Aant_geneID_05177	4315,5	1,4	7,8E-13	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_04755
Aant_geneID_28102	955,4	1,7	8,5E-13	JOSD2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11384
Aant_geneID_32930	537,2	-10,8	8,9E-13	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_31668	12885,3	-1,5	3,5E-12	CTSV	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09384
Aant_geneID_03270	560,0	3,5	3,5E-12	CD109	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06922
Aant_geneID_27732	521,7	-8,5	4,9E-12	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_37892	4113,3	2,9	7,9E-12	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_32277	1489,9	1,8	9,5E-12	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_12300
Aant_geneID_20305	2781,3	-2,4	1,1E-11	DNASE1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_14383
Aant_geneID_22819	664,2	-6,4	1,4E-11	HSP90AB1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05798
Aant_geneID_35643	1091,6	-2,8	2,7E-11	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_09394

Aant_geneID_21633	955,4	-3,2	3,1E-11	CTSB	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05306
Aant_geneID_13418	2414,9	4,0	3,7E-11	XRCC5	XRCC5	NA	Hexe_geneID_BV898_01166
Aant_geneID_29359	566,3	-3,2	5,8E-11	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_02424
Aant_geneID_34415	1792,4	-2,5	7,9E-11	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_18950
Aant_geneID_22390	5124,8	-2,6	1,0E-10	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14190
Aant_geneID_30210	1123,1	-2,9	2,1E-10	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_10016
Aant_geneID_10376	515,9	-3,1	2,5E-10	SCGN	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_11621
Aant_geneID_21686	1651,7	1,4	2,6E-10	FAF2	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13413
Aant_geneID_13906	550,8	2,9	3,1E-10	PARP2	PARP2	NA	Hexe_geneID_BV898_08059
Aant_geneID_35885	608,0	-3,2	3,7E-10	ASTL	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09470
Aant_geneID_33981	4309,8	4,7	4,6E-10	NA	TDR1	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14257
Aant_geneID_38827	3291,5	-4,6	5,2E-10	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_17831	2361,6	1,3	7,6E-10	TLL1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_13083
Aant_geneID_06343	1573,2	-2,9	7,8E-10	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14516
Aant_geneID_37042	7510,5	2,5	8,0E-10	CLEC4C	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_00747
Aant_geneID_03553	655,2	3,3	1,4E-09	CD109	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_06922
Aant_geneID_36041	502,7	-5,1	2,0E-09	TG	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04497
Aant_geneID_31215	603,0	-2,6	2,3E-09	CYB561	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09936
Aant_geneID_01766	15241,4	1,8	2,9E-09	POLR2B	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_10450
Aant_geneID_10338	54239,4	-2,4	4,6E-09	PTPN13	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08386
Aant_geneID_26370	1370,3	2,9	6,5E-09	PNKP	PNKP	NA	Hexe_geneID_BV898_14774
Aant_geneID_01740	2186,0	-1,8	6,9E-09	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_06366
Aant_geneID_15401	784,4	-1,7	7,6E-09	DDO	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_17607
Aant_geneID_35728	828,9	2,4	7,7E-09	CD63	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_04966
Aant_geneID_17825	564,5	1,9	9,2E-09	POLL	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09905
Aant_geneID_35498	1177,6	-4,8	9,7E-09	GM2A	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_14843
Aant_geneID_05805	3261,6	-2,6	1,0E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14516
Aant_geneID_24285	849,2	-2,7	1,8E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14190
Aant_geneID_01757	847,2	2,7	2,9E-08	PARP3	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07590
Aant_geneID_31558	785,3	-2,1	3,3E-08	CYB561	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09936
Aant_geneID_35636	2541,0	-2,3	4,3E-08	RIDA	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07305
Aant_geneID_34872	948,6	1,4	5,6E-08	PITHD1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_05722
Aant_geneID_27380	2330,6	-2,1	5,6E-08	DNASE1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_14383
Aant_geneID_35431	945,9	-2,5	5,9E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_18950
Aant_geneID_34997	1053,3	2,8	6,3E-08	TRPT1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08860
Aant_geneID_30326	1018,9	-1,8	6,7E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_06963
Aant_geneID_29919	1129,9	1,3	6,8E-08	NUBP1	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07259
Aant_geneID_30526	6478,4	1,7	7,2E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_07371
Aant_geneID_33234	3007,8	4,3	7,2E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_10457

Aant_geneID_39163	2275,8	-2,1	7,2E-08	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_34806	577,1	-3,0	7,2E-08	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_05032
Aant_geneID_36728	799,3	3,2	1,2E-07	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_01745	540,4	2,3	1,3E-07	SBNO1	SBNO1	NA	Hexe_geneID_BV898_05048
Aant_geneID_04489	696,2	2,4	1,3E-07	RAD50	RAD50	NA	Hexe_geneID_BV898_09974
Aant_geneID_39689	4684,2	-11,3	1,5E-07	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_34110	2151,5	2,1	1,6E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_00645
Aant_geneID_30411	14395,6	-1,5	1,6E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_03296
Aant_geneID_37387	3130,1	-3,5	1,7E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_03453
Aant_geneID_29991	13581,2	-1,3	1,8E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_03297
Aant_geneID_05573	3616,6	1,2	1,8E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_04755
Aant_geneID_31787	9358,3	-3,2	2,2E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_03888
Aant_geneID_32183	2605,5	1,7	2,5E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_01092
Aant_geneID_15772	710,3	2,6	2,6E-07	LIG1	LIG1	NA	Hexe_geneID_BV898_18082
Aant_geneID_34657	8651,3	-1,1	2,7E-07	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_30462	2730,4	-2,8	2,8E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_12940
Aant_geneID_31895	5426,4	-2,9	2,9E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_00016
Aant_geneID_33598	6568,2	-2,7	3,0E-07	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_39085	5035,4	-4,2	3,0E-07	NA	NA	Tardi	NA
Aant_geneID_29596	1610,1	-1,8	3,3E-07	CYB561	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_09937
Aant_geneID_38343	1010,5	1,8	3,6E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_10619
Aant_geneID_34629	841,4	-3,7	4,0E-07	ASTL	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_18267
Aant_geneID_36087	1679,3	-2,3	4,6E-07	RIDA	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_07305
Aant_geneID_04468	1578,8	-2,2	4,6E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_14517
Aant_geneID_27214	786,1	-3,0	6,6E-07	NA	NA	Tardi	Hexe_geneID_BV898_12940
Aant_geneID_24929	1670,7464	-2,72983	7E-07	SMOX	NA	NA	Hexe_geneID_BV898_08951

Supp Table 6: GeneID (H.exemplaris) list of Tardigrade specific gene differentially expressed in 3 species (H.exemplaris, A.antarcticus & P.fairbanksi) and in response to Irradiation and Bleomycin treatment

List of common Hexe_Aant_Pfai & common IR_Bleo Tardigrade specific DEG

Hexe_genelD_BV898_14517
Hexe_genelD_BV898_05184
Hexe_genelD_BV898_02067
Hexe_genelD_BV898_12027
Hexe_genelD_BV898_16027
Hexe_genelD_BV898_14516
Hexe_genelD_BV898_03883
Hexe_genelD_BV898_12300 => AMNP like
Hexe_genelD_BV898_00134
Hexe_genelD_BV898_10264 => AMNP like
Hexe_genelD_BV898_07371
Hexe_genelD_BV898_01090
Hexe_genelD_BV898_07261
Hexe_genelD_BV898_14257 =>TDR1
Hexe_genelD_BV898_03015
Hexe_genelD_BV898_06824
Hexe_genelD_BV898_00644
Hexe_genelD_BV898_05627
Hexe_genelD_BV898_04755
Hexe_genelD_BV898_07382
Hexe_genelD_BV898_01092
Hexe_genelD_BV898_16264
Hexe_genelD_BV898_17708
Hexe_genelD_BV898_03259
Hexe_genelD_BV898_08745

Supp Table 7: Common protein list of Tardigrade specific gene differentially expressed in response to Irradiation and Bleomycin treatment. In italic 3 of them are common with RNA seq data on 3 species (Supp Table 6)

<i>Up(+)/Down(-)</i>	<i>List of common Tardigrade specific DE protein locus ID (IR4h /IR24h/Bleomycin)</i>	<i>NCBI protein ID</i>
+	<i>BV898_14257 =>TDR1</i>	OQV11461.1
+	<i>BV898_12300 =>AMNP like</i>	OQV13448.1
+	BV898_14013	OQV11669.1
+	BV898_10262 =>AMNP like	OQV15540.1
+	BV898_06508	OQV19521.1
+	<i>BV898_10264=>AMNP like</i>	<i>OQV15542.1</i>
+	BV898_06926	OQV19074.1
+	BV898_01539	OQV24477.1;OQV24476.1
-	BV898_17845	OWA53415.1

Supp Table 8: List of significantly differentially expressed proteins IR4h vs Ctrl (green Up / blue down)

Majority_protein_IDs	Attributed_locusID	Prefered_name	log2FC (IR4 vs CT)	-log10(P_Value)	FC (IR4 vs CT)	P_Value (CT_vs_IR4)	isDifferential (IR4 vs CT)	Putative Tardigrade specific protein
OQV13463.1	BV898_12315	SQSTM1	1,92	9,73	3,78	1,85E-10	1	
OQV19074.1	BV898_06926	BV898_06926	1,84	10,04	3,59	9,16E-11	1	Tardi
OQV24956.1	BV898_01166	XRCC5	1,46	11,11	2,74	7,76E-12	1	
OQV13462.1	BV898_12314	SQSTM1	1,41	8,84	2,67	1,46E-09	1	
OQV19601.1	BV898_06375	CRYZ	1,28	4,81	2,43	1,53E-05	1	
OQV11669.1	BV898_14013	BV898_14013	1,10	6,77	2,15	1,70E-07	1	Tardi
OQV18386.1	BV898_07590	PARP3	1,02	7,01	2,03	9,76E-08	1	
OQV23520.1	BV898_02637	TK2	0,99	6,80	1,99	1,60E-07	1	
OQV21277.1	BV898_04763	BV898_04763	0,93	3,09	1,90	8,11E-04	1	Tardi
OWA53661.1	BV898_18082	LIG1	0,92	6,75	1,90	1,78E-07	1	
OWA50251.1	BV898_14774	PNKP	0,91	5,36	1,87	4,33E-06	1	
OWA52580.1	BV898_17031	BCS1L	0,89	7,91	1,86	1,23E-08	1	
OQV11461.1	BV898_14257	TDR1	0,85	8,03	1,80	9,24E-09	1	Tardi
OQV19521.1	BV898_06508	BV898_06508	0,80	4,06	1,74	8,65E-05	1	Tardi
OQV19679.1	BV898_06221	RRM2	0,72	5,00	1,65	1,01E-05	1	
OQV15542.1	BV898_10264	AMNP	0,71	7,05	1,64	8,89E-08	1	Tardi
OQV11974.1	BV898_13768	METTL1	0,71	2,53	1,63	2,92E-03	1	
AGC52845.1;OQV26202.1	BV898_00321	RAD51	0,70	4,82	1,62	1,50E-05	1	
OQV22180.1	BV898_04027	RIOK3	0,66	3,97	1,58	1,06E-04	1	
OQV24477.1;OQV24476.1	BV898_01539	BV898_01539	0,64	5,84	1,56	1,44E-06	1	Tardi
OQV26048.1	BV898_00178	JUND	0,60	6,15	1,52	7,13E-07	1	
OQV17931.1	BV898_08059	PARP2	0,60	4,79	1,52	1,64E-05	1	
OQV15372.1	BV898_10478	MACROH2A1	0,57	2,85	1,48	1,40E-03	1	
OQV19951.1;OQV19950.1	BV898_05956	BARD1	0,55	4,27	1,47	5,38E-05	1	
OQV15540.1	BV898_10262	BV898_10262	0,55	6,89	1,46	1,29E-07	1	Tardi
OQV18151.1	BV898_07739	ZFAND2B	0,54	3,02	1,46	9,53E-04	1	
OQV21154.1	BV898_04915	SPART	0,52	6,42	1,43	3,83E-07	1	
OQV12855.1	BV898_12876	CYP2J2	0,52	2,99	1,43	1,03E-03	1	
OQV18764.1	BV898_07201	SQSTM1	0,51	3,38	1,43	4,21E-04	1	
OQV16446.1	BV898_09437	PCNA	0,49	3,35	1,41	4,50E-04	1	
OWA50659.1	BV898_15169	GALM	0,48	2,95	1,40	1,13E-03	1	
OQV15124.1	BV898_10638	DIS3L2	0,45	2,41	1,36	3,88E-03	1	
OQV18655.1	BV898_07284	ARHGAP27	0,45	4,17	1,36	6,79E-05	1	
OQV24563.1	BV898_01623	LENG9	0,43	3,76	1,35	1,74E-04	1	
OQV16348.1	BV898_09493	BV898_09493	0,40	2,63	1,32	2,37E-03	1	Tardi
OQV15629.1	BV898_10216	BV898_10216	0,38	2,07	1,30	8,42E-03	1	Tardi
OWA52401.1	BV898_16858	KLF5	0,34	2,03	1,27	9,24E-03	1	
OQV13448.1	BV898_12300	BV898_12300	0,34	2,20	1,26	6,29E-03	1	Tardi
OQV24481.1	BV898_01543	DNAJA1	0,33	2,56	1,26	2,75E-03	1	

OQV13594.1	BV898_12231	TDO2	0,32	2,15	1,25	7,09E-03	1	Tardi Tardi
OWA51658.1	BV898_16133	VWA5A	0,32	3,58	1,25	2,61E-04	1	
OWA54637.1	BV898_19036	ADIPOR2	0,30	2,22	1,23	6,04E-03	1	
OWA52355.1	BV898_16810	RTF2	-0,32	2,10	0,80	7,92E-03	1	
OWA53415.1	BV898_17845	BV898_17845	-0,32	3,12	0,80	7,54E-04	1	
OQV14064.1	BV898_11729	BV898_11729	-0,33	3,05	0,80	8,89E-04	1	
OQV13455.1	BV898_12307	SQSTM1	-0,34	2,32	0,79	4,83E-03	1	
OQV14356.1	BV898_11474	TAF1	-0,40	3,50	0,76	3,13E-04	1	
OQV26244.1	BV898_00362	CAMKK2	-0,42	3,06	0,75	8,78E-04	1	
OQV16132.1	BV898_09767	TMEM63B	-0,44	3,87	0,74	1,34E-04	1	
OQV20756.1	BV898_05334	EPG5	-0,54	2,80	0,69	1,57E-03	1	
OQV24286.1	BV898_01827	PRDX1	-0,55	3,32	0,68	4,83E-04	1	
OQV18449.1	BV898_07459	PITPNA	-0,57	2,16	0,67	6,98E-03	1	
OQV20519.1	BV898_05563	MAF1	-0,62	6,44	0,65	3,66E-07	1	
OQV21784.1	BV898_04360	NOL12	-0,64	2,82	0,64	1,53E-03	1	
OQV21412.1	BV898_04621	NOP53	-0,75	2,96	0,59	1,10E-03	1	
OQV12189.1	BV898_13531	TRRAP	-0,90	2,47	0,53	3,38E-03	1	
OWA53314.1	BV898_17749	GTF2E1	-1,03	4,10	0,49	7,96E-05	1	
OWA51956.1	BV898_16415	AMOT	-1,54	4,20	0,35	6,37E-05	1	

Supp Table 9: List of significantly differentially expressed proteins IR24h vs Ctrl (green Up / blue down)

Majority_protein_IDs	Attributed_locusID	Prefered_name	log2FC (IR24 vs CT)	-log10(P_Value)	FC (IR24 vs CT)	P_Value (CT_vs_IR24)	isDifferential (IR24 vs CT)	Putative Tardigrade specific protein
OQV24956.1	BV898_01166	XRCC5	2,07	13,34	4,18	4,53E-14	1	
OQV23520.1	BV898_02637	TK2	1,75	10,19	3,37	6,44E-11	1	
OQV18386.1	BV898_07590	PARP3	1,65	9,89	3,14	1,30E-10	1	
OWA53661.1	BV898_18082	LIG1	1,55	9,82	2,92	1,52E-10	1	
OQV17931.1	BV898_08059	PARP2	1,55	10,16	2,92	6,90E-11	1	
OQV19951.1;OQV19950.1	BV898_05956	BARD1	1,49	9,74	2,81	1,81E-10	1	
OQV11669.1	BV898_14013	BV898_14013	1,39	8,11	2,62	7,69E-09	1	Tardi
OQV19679.1	BV898_06221	RRM2	1,36	8,52	2,57	3,00E-09	1	
AGC52845.1;OQV26202.1	BV898_00321	RAD51	1,33	8,36	2,52	4,39E-09	1	
OQV21277.1	BV898_04763	BV898_04763	1,33	4,62	2,51	2,39E-05	1	Tardi
OQV11461.1	BV898_14257	TDR1	1,33	10,76	2,51	1,73E-11	1	Tardi
OQV19521.1	BV898_06508	BV898_06508	1,31	6,55	2,49	2,81E-07	1	Tardi
OWA50251.1	BV898_14774	PNKP	1,19	6,84	2,28	1,43E-07	1	
OQV25999.1	BV898_00133	BV898_00133	1,18	4,60	2,27	2,50E-05	1	Tardi
OQV15542.1	BV898_10264	AMNP	1,09	9,57	2,12	2,68E-10	1	Tardi
OQV18933.1	BV898_06994	BV898_06994	1,05	5,76	2,07	1,75E-06	1	Tardi
OQV13630.1	BV898_12172	BV898_12172	1,04	2,05	2,06	8,86E-03	1	Tardi
OQV24477.1;OQV24476.1	BV898_01539	BV898_01539	0,96	8,15	1,95	7,10E-09	1	Tardi
OQV20141.1	BV898_05933	BV898_05933	0,95	3,44	1,93	3,64E-04	1	Tardi
OQV11974.1	BV898_13768	METTL1	0,93	3,53	1,91	2,92E-04	1	
OQV16446.1	BV898_09437	PCNA	0,93	6,35	1,90	4,43E-07	1	
sp POCU46.1 CAHS2_HYPDU;OQV23218.1	BV898_02951	BV898_02951	0,92	3,34	1,89	4,59E-04	1	Tardi
OQV14697.1	BV898_11072	RPRD2	0,90	2,15	1,86	7,05E-03	1	
OQV13463.1	BV898_12315	SQSTM1	0,88	5,26	1,84	5,47E-06	1	
OQV19074.1	BV898_06926	BV898_06926	0,87	5,68	1,83	2,10E-06	1	Tardi
OQV15396.1	BV898_10406	BV898_10406	0,84	3,26	1,79	5,55E-04	1	Tardi
OQV22180.1	BV898_04027	RIOK3	0,83	5,07	1,78	8,53E-06	1	
OQV21154.1	BV898_04915	SPART	0,83	9,16	1,78	6,97E-10	1	
OQV13712.1	BV898_12106	MPG	0,83	2,42	1,77	3,77E-03	1	
OWA50732.1	BV898_15239	TXN	0,82	3,44	1,77	3,66E-04	1	
OQV18892.1	BV898_07145	XRCC6	0,80	4,88	1,74	1,33E-05	1	
OQV13448.1	BV898_12300	BV898_12300	0,78	5,68	1,72	2,10E-06	1	Tardi
OQV15629.1	BV898_10216	BV898_10216	0,78	4,79	1,72	1,61E-05	1	
OQV21448.1	BV898_04654	PCK1	0,76	2,33	1,69	4,68E-03	1	
OQV26055.1;OQV26054.1	BV898_00184	BV898_00184	0,75	6,79	1,68	1,63E-07	1	Tardi
OWA52580.1	BV898_17031	BCS1L	0,74	6,83	1,67	1,47E-07	1	Tardi
OQV21189.1	BV898_04948	SORL1	0,74	6,47	1,67	3,35E-07	1	
OWA50137.1	BV898_14663	BV898_14663	0,73	2,62	1,65	2,41E-03	1	Tardi
OQV22650.1	BV898_03475	BV898_03475	0,72	3,43	1,65	3,73E-04	1	Tardi
OQV15372.1	BV898_10478	MACROH2A1	0,72	3,74	1,65	1,80E-04	1	
OQV21185.1	BV898_04945	ASF1A	0,71	3,05	1,64	8,84E-04	1	
OQV15541.1	BV898_10263	BV898_10263	0,71	3,39	1,64	4,11E-04	1	

OWA49868.1	BV898_14405	DHRS11	0,70	2,93	1,63	1,18E-03	1	
QQV16348.1	BV898_09493	BV898_09493	0,68	4,80	1,60	1,58E-05	1	Tardi
QQV16848.1	BV898_09020	RPTN	0,67	3,20	1,59	6,31E-04	1	Tardi
QQV12406.1	BV898_13357	OSGEP	0,67	2,83	1,59	1,46E-03	1	
QQV25728.1	BV898_00658	RAB11FIP3	0,66	6,74	1,58	1,81E-07	1	
QQV24563.1	BV898_01623	LENG9	0,66	5,80	1,58	1,58E-06	1	
QQV19601.1	BV898_06375	CRYZ	0,64	2,17	1,56	6,81E-03	1	
QQV12605.1	BV898_13167	XRCC6	0,64	4,94	1,56	1,15E-05	1	
QQV15540.1	BV898_10262	BV898_10262	0,64	7,80	1,56	1,57E-08	1	Tardi
QQV24785.1	BV898_01375	SPARC	0,64	4,03	1,55	9,39E-05	1	
OWA53212.1	BV898_17645	QPCT	0,63	4,99	1,55	1,01E-05	1	
QQV23789.1	BV898_02515	BV898_02515	0,62	2,97	1,54	1,07E-03	1	Tardi
OWA52718.1	BV898_17164	CSMD3	0,61	5,35	1,53	4,46E-06	1	
OWA52270.1	BV898_16728	DPH3	0,61	2,79	1,53	1,61E-03	1	
QQV23600.1	BV898_02347	KLKB1	0,61	2,02	1,52	9,56E-03	1	
QQV21891.1;QQV21898.1	BV898_04104	BV898_04104	0,60	2,60	1,52	2,51E-03	1	Tardi
QQV13462.1	BV898_12314	SQSTM1	0,60	4,20	1,52	6,24E-05	1	
QQV22790.1	BV898_03226	PIP4P1	0,58	2,09	1,49	8,07E-03	1	
QQV11519.1	BV898_14175	BV898_14175	0,57	2,96	1,48	1,10E-03	1	Tardi
OWA52677.1	BV898_17123	TRIM71	0,57	2,11	1,48	7,81E-03	1	
QQV18546.1	BV898_07371	BV898_07371	0,57	3,08	1,48	8,23E-04	1	Tardi
QQV26048.1	BV898_00178	JUND	0,57	5,82	1,48	1,52E-06	1	
QQV23646.1	BV898_02389	RBM17	0,56	2,75	1,47	1,79E-03	1	
QQV13594.1	BV898_12231	TDO2	0,55	4,04	1,46	9,08E-05	1	
QQV24306.1	BV898_01845	SOD1	0,54	3,89	1,45	1,30E-04	1	
QQV25078.1	BV898_01286	NAPRT	0,54	3,08	1,45	8,24E-04	1	
QQV13511.1	BV898_12258	TMPRSS11F	0,53	3,87	1,45	1,35E-04	1	
QQV18151.1	BV898_07739	ZFAND2B	0,53	2,93	1,44	1,18E-03	1	
OWA54118.1	BV898_18536	LIG4	0,53	4,27	1,44	5,42E-05	1	
QQV12620.1	BV898_13110	CHMP2B	0,53	4,18	1,44	6,55E-05	1	
OWA53868.1	BV898_18287	TMEM184B	0,52	5,51	1,44	3,06E-06	1	
QQV25220.1	BV898_00908	ATF2	0,52	2,40	1,44	3,96E-03	1	
QQV18057.1	BV898_07828	CTSL	0,52	2,78	1,44	1,64E-03	1	
QQV15872.1	BV898_09968	PPP1R11	0,52	2,01	1,43	9,85E-03	1	
QQV14678.1	BV898_11184	CTRL	0,51	2,89	1,43	1,28E-03	1	
OWA51725.1	BV898_16197	HSPB2	0,51	2,88	1,43	1,33E-03	1	
QQV15131.1	BV898_10646	PEX19	0,51	2,26	1,43	5,54E-03	1	
QQV15094.1	BV898_10725	ZUP1	0,51	2,80	1,42	1,60E-03	1	
QQV22825.1	BV898_03259	BV898_03259	0,50	3,09	1,42	8,18E-04	1	Tardi
QQV21676.1	BV898_04251	BV898_04251	0,50	2,70	1,41	2,01E-03	1	Tardi
QQV12861.1	BV898_12881	BV898_12881	0,50	4,33	1,41	4,71E-05	1	Tardi
QQV24573.1	BV898_01633	BV898_01633	0,49	3,49	1,41	3,20E-04	1	
QQV12840.1	BV898_12861	TLL2	0,49	3,34	1,41	4,52E-04	1	
QQV11502.1	BV898_14160	BV898_14160	0,49	2,99	1,40	1,01E-03	1	Tardi
QQV13400.1	BV898_12352	CHMP1A	0,48	3,48	1,40	3,30E-04	1	
OWA54170.1	BV898_18585	DNAAF11	0,48	3,61	1,40	2,46E-04	1	
QQV15292.1	BV898_10523	BV898_10523	0,48	2,41	1,40	3,89E-03	1	Tardi
QQV18764.1	BV898_07201	SQSTM1	0,47	3,09	1,39	8,13E-04	1	
QQV21113.1;QQV21114.1	BV898_04877	ERI3	0,47	3,50	1,39	3,13E-04	1	

OQV14335.1	BV898_11453	BV898_11453	0,47	3,24	1,39	5,77E-04	1	Tardi
OQV23568.1	BV898_02686	BV898_02686	0,47	2,41	1,38	3,85E-03	1	Tardi
OWA52246.1	BV898_16704	C7orf50	0,47	3,28	1,38	5,26E-04	1	
OQV24539.1	BV898_01599	BV898_01599	0,47	2,12	1,38	7,61E-03	1	Tardi
OWA51354.1	BV898_15840	GPN2	0,47	2,80	1,38	1,60E-03	1	
OWA51225.1	BV898_15719	BV898_15719	0,47	3,77	1,38	1,71E-04	1	Tardi
OQV17276.1	BV898_08674	IGFALS	0,45	4,54	1,37	2,89E-05	1	
OQV12040.1	BV898_13690	P DPR	0,45	2,75	1,36	1,79E-03	1	
OWA53135.1	BV898_17570	CTSV	0,44	2,74	1,36	1,84E-03	1	
OQV25751.1	BV898_00680	BV898_00680	0,44	3,01	1,36	9,83E-04	1	Tardi
OQV15330.1	BV898_10556	BV898_10556	0,44	2,14	1,36	7,25E-03	1	Tardi
OQV16454.1	BV898_09444	SAP30L	0,44	2,30	1,36	5,00E-03	1	
OQV12823.1	BV898_12952	KRI1	0,44	2,37	1,35	4,26E-03	1	
OQV22942.1	BV898_02994	BV898_02994	0,43	2,02	1,35	9,46E-03	1	Tardi
OWA50788.1	BV898_15295	POLR2J	0,43	2,73	1,35	1,87E-03	1	
OWA52821.1	BV898_17264	BST1	0,43	2,19	1,35	6,47E-03	1	
OQV17798.1	BV898_08094	BV898_08094	0,43	2,06	1,35	8,81E-03	1	Tardi
OQV18580.1	BV898_07406	ERI1	0,43	2,71	1,35	1,96E-03	1	
OQV15124.1	BV898_10638	DIS3L2	0,43	2,31	1,35	4,89E-03	1	
OQV18095.1	BV898_07866	FAM177A1	0,43	2,47	1,35	3,41E-03	1	
OQV24807.1	BV898_01398	BV898_01398	0,42	3,07	1,34	8,50E-04	1	Tardi
OQV16566.1	BV898_09240	CHMP4B	0,42	3,98	1,34	1,05E-04	1	
OQV18655.1	BV898_07284	ARHGAP27	0,42	3,92	1,34	1,19E-04	1	
OQV14190.1	BV898_11662	XRCC1	0,42	3,68	1,34	2,09E-04	1	
OQV19138.1	BV898_06776	VWA5A	0,41	4,97	1,33	1,07E-05	1	
OQV23451.1	BV898_02573	BV898_02573	0,41	2,82	1,33	1,52E-03	1	Tardi
OQV19096.1	BV898_06951	EIF2B5	0,41	3,78	1,33	1,64E-04	1	
OQV12855.1	BV898_12876	CYP2J2	0,41	2,21	1,32	6,20E-03	1	
OWA52491.1	BV898_16943	TFAP2A	0,40	2,46	1,32	3,46E-03	1	
OQV12155.1	BV898_13572	BV898_13572	0,40	2,28	1,32	5,21E-03	1	
OQV25146.1	BV898_00836	BANF1	0,40	3,42	1,32	3,84E-04	1	
OQV22651.1	BV898_03476	ACSBG1	0,40	4,27	1,32	5,36E-05	1	
OQV12313.1	BV898_13424	BV898_13424	0,40	2,45	1,32	3,55E-03	1	Tardi
OQV22714.1	BV898_03543	FLT1	0,40	4,34	1,32	4,57E-05	1	
OQV16964.1	BV898_08969	BV898_08969	0,39	3,96	1,31	1,09E-04	1	Tardi
OQV23630.1	BV898_02373	PPP1R37	0,39	4,33	1,31	4,62E-05	1	
OQV19509.1	BV898_06497	BV898_06497	0,39	3,48	1,31	3,32E-04	1	Tardi
OQV14478.1	BV898_11320	BV898_11320	0,37	3,12	1,30	7,51E-04	1	
OQV13593.1	BV898_12230	TDO2	0,37	2,31	1,29	4,93E-03	1	
OQV24450.1	BV898_01514	FRA10AC1	0,36	2,02	1,29	9,51E-03	1	
OWA49859.1	BV898_14396	BV898_14396	0,36	2,12	1,29	7,66E-03	1	
OQV19139.1	BV898_06777	VWA5A	0,36	2,41	1,29	3,89E-03	1	
OQV16351.1	BV898_09496	C9orf78	0,36	2,30	1,29	4,98E-03	1	
OWA52059.1;OWA52058.1	BV898_16522	ABCB6	0,36	3,71	1,28	1,95E-04	1	
OWA50238.1	BV898_14761	BV898_14761	0,35	2,02	1,28	9,63E-03	1	Tardi
OQV12483.1	BV898_13284	PPT2	0,35	2,35	1,28	4,45E-03	1	
OQV13770.1	BV898_11990	MEX3C	0,35	2,28	1,28	5,21E-03	1	
OQV15742.1	BV898_10131	RPA3	0,35	2,31	1,28	4,94E-03	1	
OQV20099.1	BV898_05892	CUBN	0,35	3,23	1,27	5,85E-04	1	

QQV22396.1	BV898_03572	LRPAP1	0,34	2,14	1,27	7,28E-03	1	
QQV15509.1	BV898_10375	OPN4	0,34	2,59	1,27	2,59E-03	1	
QQV16995.1	BV898_08860	TRPT1	0,34	4,44	1,27	3,66E-05	1	
QQV18556.1	BV898_07382	BV898_07382	0,34	2,82	1,27	1,50E-03	1	Tardi
OWA51658.1	BV898_16133	VWA5A	0,34	3,81	1,26	1,54E-04	1	
QQV24960.1	BV898_01170	TEX2	0,34	2,61	1,26	2,43E-03	1	
QQV21139.1;ALT32101.1	BV898_04901	WIPI2	0,34	2,62	1,26	2,42E-03	1	
QQV12203.1	BV898_13545	BV898_13545	0,33	2,61	1,26	2,44E-03	1	
QQV16851.1	BV898_09023	BV898_09023	0,33	2,07	1,26	8,61E-03	1	Tardi
OWA53399.1	BV898_17830	INTS9	0,33	3,35	1,25	4,49E-04	1	
OWA53268.1	BV898_17701	VAMP4	0,32	2,17	1,25	6,72E-03	1	
QQV21269.1	BV898_04755	BV898_04755	0,32	3,94	1,25	1,15E-04	1	Tardi
OWA53980.1	BV898_18403	CNOT10	0,32	2,74	1,25	1,82E-03	1	
QQV14030.1	BV898_11801	HAL	0,32	2,52	1,25	3,05E-03	1	
QQV16625.1	BV898_09294	BRD2	0,32	2,99	1,25	1,02E-03	1	
QQV26191.1	BV898_00311	BV898_00311	0,32	3,06	1,25	8,71E-04	1	Tardi
QQV12675.1	BV898_13083	TLL1	0,32	2,35	1,25	4,45E-03	1	
QQV19906.1;QQV19907.1	BV898_06175	SERPINB9	0,32	3,01	1,25	9,84E-04	1	
QQV25041.1;QQV22225.1;QQV15271.1;QQV14272.1	BV898_01248	UBA52	0,32	2,34	1,24	4,53E-03	1	
QQV13847.1	BV898_11956	POLR2C	0,31	2,52	1,24	3,01E-03	1	
OWA54823.1	BV898_19217	BV898_19217	0,31	2,04	1,24	9,15E-03	1	Tardi
QQV16319.1	BV898_09627	ADH1C	0,31	2,45	1,24	3,55E-03	1	
QQV24481.1	BV898_01543	DNAJA1	0,31	2,31	1,24	4,86E-03	1	
QQV17261.1	BV898_08659	FABP7	0,31	3,52	1,24	3,03E-04	1	
QQV23224.1;QQV23223.1	BV898_02955	BV898_02955	0,30	2,33	1,23	4,64E-03	1	Tardi
QQV22758.1	BV898_03195	BV898_03195	0,30	2,06	1,23	8,73E-03	1	Tardi
OWA50399.1	BV898_14918	BV898_14918	0,30	2,12	1,23	7,58E-03	1	Tardi
QQV24418.1	BV898_01950	BV898_01950	-0,30	2,28	0,81	5,26E-03	1	Tardi
OWA53106.1	BV898_17539	NVL	-0,30	2,19	0,81	6,39E-03	1	
QQV19877.1;QQV19880.1	BV898_06145	EDEM1	-0,31	4,05	0,81	8,92E-05	1	
QQV23886.1	BV898_02235	PTRH2	-0,31	2,11	0,81	7,79E-03	1	
QQV11478.1	BV898_14207	BV898_14207	-0,31	3,20	0,81	6,37E-04	1	Tardi
QQV24411.1;QQV24410.1	BV898_01943	MAP2K4	-0,31	4,12	0,81	7,54E-05	1	
OWA52099.1	BV898_16561	RPS8	-0,31	2,37	0,81	4,25E-03	1	
QQV24347.1	BV898_01885	RPS6	-0,31	2,08	0,81	8,33E-03	1	
QQV14949.1	BV898_10853	RBK5	-0,32	2,01	0,80	9,85E-03	1	
QQV26244.1	BV898_00362	CAMKK2	-0,32	2,17	0,80	6,70E-03	1	
QQV24570.1	BV898_01630	CELF3	-0,33	3,18	0,80	6,57E-04	1	
QQV22753.1;QQV22752.1	BV898_03190	PBRM1	-0,33	2,52	0,80	3,03E-03	1	
QQV14290.1	BV898_11527	SRSF1	-0,33	2,18	0,80	6,63E-03	1	
QQV17571.1	BV898_08342	RPS25	-0,33	2,38	0,79	4,17E-03	1	
QQV23884.1	BV898_02233	TMX2	-0,33	3,71	0,79	1,94E-04	1	
QQV19153.1	BV898_06792	RPL13	-0,34	2,15	0,79	7,16E-03	1	
QQV25345.1	BV898_01024	SLC25A1	-0,35	2,35	0,78	4,43E-03	1	
QQV24955.1	BV898_01165	SF3B6	-0,36	2,68	0,78	2,09E-03	1	
QQV18194.1	BV898_07784	TPH1	-0,36	2,32	0,78	4,82E-03	1	
QQV19545.1	BV898_06532	GCHFR	-0,36	2,24	0,78	5,70E-03	1	
OWA54698.1	BV898_19099	PAPOLG	-0,36	2,70	0,78	2,02E-03	1	
QQV20721.1	BV898_05303	KIAA0513	-0,36	2,97	0,78	1,08E-03	1	

OQV16643.1	BV898_09313	CHD7	-0,36	2,90	0,78	1,26E-03	1	
OQV22371.1	BV898_03869	DNAJC15	-0,36	2,67	0,78	2,14E-03	1	
OQV25113.1	BV898_00805	SLC25A12	-0,37	2,01	0,78	9,69E-03	1	
OWA53415.1	BV898_17845	BV898_17845	-0,37	3,65	0,77	2,24E-04	1	Tardi
OQV16120.1	BV898_09755	RPL37	-0,37	2,29	0,77	5,18E-03	1	
OQV21453.1	BV898_04658	BV898_04658	-0,37	2,48	0,77	3,35E-03	1	Tardi
OQV25893.1	BV898_00037	TTN	-0,38	5,88	0,77	1,32E-06	1	
OQV15972.1;OQV15971.1	BV898_09893	PARD3	-0,39	3,33	0,76	4,73E-04	1	
OQV14152.1	BV898_11625	IRF2BP2	-0,39	2,01	0,76	9,67E-03	1	
OWA53126.1	BV898_17559	RPL21	-0,40	2,15	0,76	7,15E-03	1	
OWA52897.1	BV898_17338	UGT8	-0,40	2,89	0,76	1,27E-03	1	
OWA52191.1	BV898_16650	NDUFA11	-0,40	2,40	0,76	3,95E-03	1	
OQV25248.1;OQV25249.1	BV898_00934	LARS1	-0,41	4,05	0,75	8,89E-05	1	
OQV17478.1	BV898_08413	MMAA	-0,41	3,44	0,75	3,62E-04	1	
OQV17810.1;OQV17812.1	BV898_08106	FHL2	-0,41	3,36	0,75	4,35E-04	1	
OQV20336.1	BV898_05623	RPS18	-0,41	2,85	0,75	1,42E-03	1	
YP_004123096.1;CBY83889.1	#N/A	ATP8	-0,41	4,23	0,75	5,90E-05	1	
OQV21252.1	BV898_04739	POLR1C	-0,41	2,19	0,75	6,47E-03	1	
OQV20556.1	BV898_05378	PXDN	-0,42	2,96	0,75	1,09E-03	1	
OQV13186.1	BV898_12614	NCKAP1	-0,42	2,28	0,75	5,27E-03	1	
OQV17981.1;OQV17984.1	BV898_07923	LACTB	-0,43	2,15	0,74	7,11E-03	1	
OWA51880.1	BV898_16341	BV898_16341	-0,43	2,29	0,74	5,07E-03	1	
OQV11826.1	BV898_13881	STRIP1	-0,44	2,51	0,74	3,07E-03	1	
OQV14015.1	BV898_11786	CYP3A4	-0,44	2,48	0,74	3,34E-03	1	
OQV25892.1	BV898_00036	BV898_00036	-0,44	3,17	0,74	6,70E-04	1	
OQV15511.1	BV898_10377	ODR4	-0,45	3,03	0,73	9,38E-04	1	
OQV16132.1	BV898_09767	TMEM63B	-0,45	3,96	0,73	1,09E-04	1	
OQV11770.1	BV898_13965	RPL18	-0,45	2,10	0,73	7,99E-03	1	
OWA52355.1	BV898_16810	RTF2	-0,45	3,26	0,73	5,49E-04	1	
OQV11997.1	BV898_13721	NUDT14	-0,45	2,93	0,73	1,17E-03	1	
OQV24479.1	BV898_01541	ETNPPL	-0,47	2,77	0,72	1,71E-03	1	
OWA52151.1;OWA52150.1	BV898_16611	GUF1	-0,48	2,43	0,72	3,71E-03	1	
OQV14029.1	BV898_11800	BV898_11800	-0,48	2,32	0,72	4,78E-03	1	
OWA51888.1	BV898_16349	ECI2	-0,51	2,66	0,70	2,17E-03	1	
OQV26262.1	BV898_00380	CDC34	-0,51	2,18	0,70	6,61E-03	1	
OQV17480.1;OQV17479.1;OQV25871.1	BV898_08414	PRDM4	-0,52	2,05	0,70	8,87E-03	1	
OQV16844.1	BV898_09016	CYP51A1	-0,52	3,46	0,70	3,50E-04	1	
OQV13273.1	BV898_12479	CLPTM1L	-0,53	2,37	0,69	4,24E-03	1	
OQV14865.1	BV898_10897	GOT2	-0,56	2,89	0,68	1,29E-03	1	
OQV22271.1	BV898_03774	POLR2K	-0,56	2,08	0,68	8,35E-03	1	
OQV14356.1	BV898_11474	TAF1	-0,57	5,10	0,68	7,87E-06	1	
OQV21521.1	BV898_04423	TLL1	-0,57	2,19	0,67	6,50E-03	1	
OQV13873.1	BV898_11871	TGFBRAP1	-0,57	2,93	0,67	1,16E-03	1	
OQV25704.1	BV898_00635	RPL35	-0,57	2,37	0,67	4,28E-03	1	
OQV12467.1	BV898_13267	HPRT1	-0,58	2,08	0,67	8,39E-03	1	
OQV26099.1	BV898_00225	CHDH	-0,58	2,20	0,67	6,35E-03	1	
OQV13857.1	BV898_11964	DIAPH3	-0,58	2,89	0,67	1,29E-03	1	
OQV24766.1	BV898_01357	SRM	-0,58	2,19	0,67	6,46E-03	1	
OWA53038.1	BV898_17474	BV898_17474	-0,59	2,07	0,66	8,58E-03	1	Tardi

OQV21198.1	BV898_04957	PANK1	-0,62	2,43	0,65	3,76E-03	1	
OQV13285.1	BV898_12491	POLB	-0,63	2,79	0,65	1,62E-03	1	
OQV13267.1	BV898_12474	MRPL17	-0,63	3,32	0,65	4,80E-04	1	
OQV20630.1;OQV20629.1	BV898_05447	BV898_05447	-0,63	2,55	0,65	2,82E-03	1	Tardi
OWA49944.1	BV898_14478	BV898_14478	-0,63	2,51	0,65	3,10E-03	1	Tardi
OQV22014.1	BV898_04224	ENTPD1	-0,63	2,20	0,64	6,36E-03	1	
OWA50079.1	BV898_14605	MECR	-0,66	2,39	0,63	4,10E-03	1	
OQV20756.1	BV898_05334	EPG5	-0,67	3,56	0,63	2,75E-04	1	
OQV24286.1	BV898_01827	PRDX1	-0,74	4,54	0,60	2,86E-05	1	
OWA53691.1	BV898_18113	PARG	-0,75	2,01	0,60	9,81E-03	1	
OWA54581.1	BV898_18981	DST	-0,78	3,02	0,58	9,49E-04	1	
OQV21411.1	BV898_04620	MMGT1	-0,79	2,45	0,58	3,52E-03	1	
OWA49780.1	BV898_14317	NHP2	-0,81	2,80	0,57	1,58E-03	1	
OQV21412.1	BV898_04621	NOP53	-0,84	3,38	0,56	4,12E-04	1	
OQV14285.1	BV898_11522	COA7	-0,85	2,48	0,55	3,29E-03	1	
OQV17474.1	BV898_08408	ZMYND8	-0,85	2,57	0,55	2,69E-03	1	
OQV18063.1	BV898_07834	NDUFA6	-0,87	2,13	0,55	7,33E-03	1	
OQV21423.1;OQV21422.1	BV898_04631	RMND5B	-0,88	2,53	0,54	2,93E-03	1	
OWA52478.1;OWA52476.1	BV898_16931	PNLIPRP1	-0,91	3,83	0,53	1,47E-04	1	
OQV22489.1	BV898_03664	RAPSN	-0,91	2,09	0,53	8,18E-03	1	
OWA53314.1	BV898_17749	GTF2E1	-0,94	3,71	0,52	1,96E-04	1	
OWA53388.1	BV898_17818	C15orf40	-0,97	2,66	0,51	2,21E-03	1	
OQV23354.1;OQV23353.1	BV898_02800	EDEM3	-1,03	2,27	0,49	5,41E-03	1	
OWA54371.1	BV898_18775	BV898_18775	-1,30	2,23	0,41	5,87E-03	1	Tardi
OWA51956.1	BV898_16415	AMOT	-1,54	4,21	0,34	6,13E-05	1	
OWA50929.1	BV898_15430	BV898_15430	-1,59	2,62	0,33	2,38E-03	1	Tardi
YP_004123106.1;CBY83899.1	#N/A	MT-CYB	-1,65	2,29	0,32	5,15E-03	1	

Supp Table 10: List of significantly differentially expressed proteins Bleomycin vs Ctrl (green Up / blue down)

Majority_protein_IDs	Attributed_locusID	Prefered_name	log2FC (Bleo vs CT)	-log10(P_Value)	FC (Bleo vs CT)	P_Value (CT_vs_Bleo)	isDifferential (Bleo vs CT)	Putative Tardigrade specific protein
OQV11669.1	BV898_14013	BV898_14013	2,18	10,88	4,54	1,31E-11	1	Tardi
OQV11670.1	BV898_14014	BV898_14014	2,04	9,27	4,10	5,35E-10	1	Tardi
OQV24627.1	BV898_01686	DUSP11	1,60	7,27	3,02	5,43E-08	1	
OQV18546.1	BV898_07371	BV898_07371	1,56	8,10	2,94	7,94E-09	1	Tardi
OQV18386.1	BV898_07590	PARP3	1,38	8,77	2,60	1,68E-09	1	
OQV15539.1	BV898_10261	BV898_10261	1,29	7,54	2,45	2,90E-08	1	Tardi
OQV17931.1	BV898_08059	PARP2	1,26	8,88	2,39	1,31E-09	1	
OWA53661.1	BV898_18082	LIG1	1,24	8,48	2,37	3,33E-09	1	
OQV16446.1	BV898_09437	PCNA	1,24	8,01	2,36	9,79E-09	1	
OQV23520.1	BV898_02637	TK2	1,19	7,86	2,29	1,38E-08	1	
OWA50251.1	BV898_14774	PNKP	1,18	6,77	2,26	1,68E-07	1	
OWA50223.1	BV898_14748	BV898_14748	1,18	4,79	2,26	1,63E-05	1	Tardi
AGC52845.1;OQV26202.1	BV898_00321	RAD51	1,17	7,61	2,25	2,48E-08	1	
OWA54640.1;OWA55395.1;OQV18996.1	BV898_19039	BV898_19039	1,17	4,54	2,25	2,88E-05	1	Tardi
OQV18574.1	BV898_07400	BV898_07400	1,16	4,50	2,23	3,14E-05	1	
OQV19679.1	BV898_06221	RRM2	1,15	7,53	2,22	2,94E-08	1	
OQV16848.1	BV898_09020	RPTN	1,15	5,64	2,22	2,31E-06	1	
OQV13448.1	BV898_12300	BV898_12300	1,15	7,80	2,21	1,60E-08	1	Tardi
OQV24573.1	BV898_01633	BV898_01633	1,12	7,64	2,18	2,28E-08	1	
OQV13640.1	BV898_12111	BV898_12111	1,09	2,03	2,13	9,37E-03	1	Tardi
OQV15951.1;OQV15952.1	BV898_09873	POLR1F	1,07	3,96	2,10	1,10E-04	1	
OQV15292.1	BV898_10523	BV898_10523	1,04	5,65	2,06	2,22E-06	1	Tardi
OQV19951.1;OQV19950.1	BV898_05956	BARD1	1,03	7,54	2,05	2,85E-08	1	
OQV24956.1	BV898_01166	XRCC5	1,02	8,92	2,03	1,20E-09	1	
OQV18933.1	BV898_06994	BV898_06994	1,02	5,62	2,03	2,41E-06	1	Tardi
OQV13619.1	BV898_12162	BV898_12162	1,02	5,19	2,02	6,48E-06	1	Tardi
OQV25751.1	BV898_00680	BV898_00680	1,02	6,94	2,02	1,15E-07	1	Tardi
OQV12313.1	BV898_13424	BV898_13424	0,96	6,33	1,95	4,72E-07	1	Tardi
OQV15372.1	BV898_10478	MACROH2A1	0,95	5,03	1,93	9,24E-06	1	
OQV18394.1	BV898_07597	BV898_07597	0,94	5,21	1,92	6,12E-06	1	Tardi
OQV22180.1	BV898_04027	RIOK3	0,90	5,47	1,87	3,43E-06	1	
OQV14190.1	BV898_11662	XRCC1	0,89	7,55	1,86	2,80E-08	1	
OQV12675.1	BV898_13083	TLL1	0,89	7,00	1,86	1,01E-07	1	Tardi
OQV13463.1	BV898_12315	SQSTM1	0,86	5,18	1,82	6,56E-06	1	
OQV15542.1	BV898_10264	AMNP	0,85	8,06	1,80	8,72E-09	1	Tardi
OQV18803.1	BV898_07060	DHRS11	0,84	2,71	1,79	1,96E-03	1	
OQV21113.1;OQV21114.1	BV898_04877	ERI3	0,84	6,25	1,79	5,57E-07	1	
OQV11461.1	BV898_14257	TDR1	0,82	7,78	1,76	1,65E-08	1	Tardi
OWA50732.1	BV898_15239	TXN	0,81	3,39	1,76	4,08E-04	1	
OWA50683.1	BV898_15193	PXDND	0,81	7,09	1,75	8,16E-08	1	
OWA52580.1	BV898_17031	BCS1L	0,79	7,22	1,73	6,08E-08	1	
OQV13350.1;OWA54893.1	BV898_12386	BV898_12386	0,78	4,71	1,71	1,95E-05	1	Tardi

QQV18892.1	BV898_07145	XRCC6	0,75	4,57	1,68	2,68E-05	1	
QQV19140.1	BV898_06780	UNC79	0,73	3,57	1,66	2,71E-04	1	
OWA50953.1	BV898_15454	BV898_15454	0,73	5,09	1,65	8,17E-06	1	Tardi
QQV14335.1	BV898_11453	BV898_11453	0,73	5,14	1,65	7,26E-06	1	Tardi
QQV20099.1	BV898_05892	CUBN	0,72	6,79	1,65	1,61E-07	1	
QQV21274.1	BV898_04760	CKAP5	0,72	3,14	1,65	7,24E-04	1	
QQV25081.1	BV898_01289	BV898_01289	0,72	3,76	1,65	1,74E-04	1	Tardi
QQV24899.1	BV898_01481	BV898_01481	0,72	2,20	1,65	6,35E-03	1	Tardi
QQV16788.1	BV898_09144	NID2	0,72	2,58	1,64	2,65E-03	1	
QQV15330.1	BV898_10556	BV898_10556	0,70	3,70	1,62	2,01E-04	1	Tardi
QQV13303.1	BV898_12509	PHKG2	0,66	3,31	1,58	4,89E-04	1	
QQV19521.1	BV898_06508	BV898_06508	0,65	3,20	1,57	6,38E-04	1	Tardi
QQV22758.1	BV898_03195	BV898_03195	0,64	4,93	1,56	1,17E-05	1	Tardi
QQV25078.1	BV898_01286	NAPRT	0,62	3,63	1,54	2,34E-04	1	
OWA50137.1	BV898_14663	BV898_14663	0,62	2,15	1,54	7,10E-03	1	Tardi
QQV15541.1	BV898_10263	BV898_10263	0,61	2,82	1,53	1,52E-03	1	Tardi
OWA53343.1	BV898_17776	BV898_17776	0,59	2,93	1,51	1,16E-03	1	Tardi
QQV26017.1	BV898_00148	ASTL	0,58	4,01	1,50	9,82E-05	1	
OWA50748.1	BV898_15254	BV898_15254	0,57	2,95	1,49	1,13E-03	1	Tardi
QQV18764.1	BV898_07201	SQSTM1	0,57	3,80	1,48	1,60E-04	1	
QQV12605.1	BV898_13167	XRCC6	0,56	4,30	1,47	4,98E-05	1	
QQV13462.1	BV898_12314	SQSTM1	0,55	3,83	1,47	1,47E-04	1	
QQV12861.1	BV898_12881	BV898_12881	0,55	4,81	1,46	1,55E-05	1	Tardi
QQV22414.1	BV898_03588	DDX49	0,55	2,87	1,46	1,34E-03	1	
QQV16851.1	BV898_09023	BV898_09023	0,55	3,76	1,46	1,76E-04	1	Tardi
OWA54746.1	BV898_19145	TMPPSS9	0,54	2,39	1,45	4,06E-03	1	
QQV12609.1;QQV12608.1	BV898_13100	PPP1R12A	0,53	3,04	1,44	9,10E-04	1	
QQV22650.1	BV898_03475	BV898_03475	0,52	2,33	1,44	4,70E-03	1	Tardi
QQV24477.1;QQV24476.1	BV898_01539	BV898_01539	0,52	4,83	1,44	1,47E-05	1	Tardi
QQV23451.1	BV898_02573	BV898_02573	0,52	3,74	1,44	1,82E-04	1	Tardi
QQV24563.1	BV898_01623	LENG9	0,51	4,57	1,43	2,68E-05	1	
QQV19074.1	BV898_06926	BV898_06926	0,51	3,23	1,42	5,94E-04	1	Tardi
OWA52225.1	BV898_16683	DHRS11	0,50	3,44	1,42	3,60E-04	1	
QQV20462.1	BV898_05507	BV898_05507	0,50	2,05	1,42	8,89E-03	1	Tardi
QQV23504.1;QQV23503.1	BV898_02623	BV898_02623	0,49	3,87	1,41	1,34E-04	1	
QQV21954.1	BV898_04165	BV898_04165	0,49	3,32	1,40	4,77E-04	1	Tardi
QQV22826.1	BV898_03260	BV898_03260	0,49	2,51	1,40	3,10E-03	1	Tardi
QQV15629.1	BV898_10216	BV898_10216	0,48	2,82	1,40	1,53E-03	1	Tardi
QQV20952.1	BV898_05027	AP3S1	0,48	2,56	1,40	2,76E-03	1	
QQV17261.1	BV898_08659	FABP7	0,48	5,55	1,39	2,82E-06	1	
OWA54118.1	BV898_18536	LIG4	0,47	3,79	1,39	1,63E-04	1	
QQV15581.1	BV898_10301	BV898_10301	0,46	4,56	1,38	2,74E-05	1	Tardi
QQV12639.1	BV898_13128	RMND1	0,46	4,44	1,37	3,65E-05	1	
QQV13811.1	BV898_11922	CHRNA3	0,44	2,54	1,36	2,88E-03	1	
QQV12040.1	BV898_13690	P DPR	0,44	2,69	1,35	2,06E-03	1	
QQV13957.1	BV898_11839	BV898_11839	0,44	2,21	1,35	6,23E-03	1	Tardi
QQV15350.1	BV898_10456	BV898_10456	0,43	3,44	1,35	3,65E-04	1	
QQV17276.1	BV898_08674	IGFALS	0,42	4,21	1,34	6,11E-05	1	
QQV11502.1	BV898_14160	BV898_14160	0,41	2,42	1,33	3,77E-03	1	Tardi

QQV22396.1	BV898_03572	LRPAP1	0,41	2,64	1,33	2,27E-03	1	
OWA52718.1	BV898_17164	CSMD3	0,40	3,39	1,32	4,07E-04	1	
QQV18556.1	BV898_07382	BV898_07382	0,39	3,35	1,31	4,43E-04	1	Tardi
QQV23512.1	BV898_02629	GABARAPL2	0,39	2,74	1,31	1,84E-03	1	
QQV15594.1	BV898_10186	PLD3	0,39	3,21	1,31	6,17E-04	1	
QQV24526.1	BV898_01587	CPN2	0,39	3,08	1,31	8,35E-04	1	
OWA51658.1	BV898_16133	VWA5A	0,39	4,39	1,31	4,10E-05	1	
QQV13594.1	BV898_12231	TDO2	0,39	2,67	1,31	2,12E-03	1	
QQV25888.1	BV898_00034	NPR1	0,38	2,04	1,30	9,18E-03	1	
QQV16995.1	BV898_08860	TRPT1	0,38	4,90	1,30	1,27E-05	1	
QQV23028.1	BV898_03077	BV898_03077	0,36	3,27	1,29	5,43E-04	1	Tardi
QQV26048.1	BV898_00178	JUND	0,36	3,72	1,29	1,92E-04	1	
QQV22630.1	BV898_03455	PXDN	0,36	2,07	1,29	8,57E-03	1	
QQV15540.1	BV898_10262	BV898_10262	0,35	4,61	1,28	2,47E-05	1	Tardi
QQV24306.1	BV898_01845	SOD1	0,35	2,33	1,28	4,71E-03	1	
QQV19585.1	BV898_06359	ATP2B3	0,35	2,79	1,27	1,63E-03	1	
QQV13305.1	BV898_12513	VWA5A	0,35	2,22	1,27	6,08E-03	1	
OWA52599.1	BV898_17048	CHIT1	0,34	3,78	1,27	1,66E-04	1	
QQV16328.1	BV898_09475	EIF1AD	0,34	2,90	1,26	1,25E-03	1	
OWA54115.1	BV898_18532	ALDH16A1	0,33	2,06	1,26	8,71E-03	1	
QQV22166.1	BV898_04013	BV898_04013	0,33	2,63	1,26	2,37E-03	1	Tardi
QQV21189.1	BV898_04948	SORL1	0,33	2,80	1,26	1,58E-03	1	
QQV21154.1	BV898_04915	SPART	0,33	4,12	1,26	7,55E-05	1	
QQV18003.1	BV898_07945	F11	0,33	4,03	1,26	9,38E-05	1	
OWA50803.1	BV898_15310	CES4A	0,33	2,50	1,25	3,13E-03	1	
QQV22714.1	BV898_03543	FLT1	0,33	3,49	1,25	3,21E-04	1	
QQV19912.1	BV898_06180	PRKD1	0,32	3,58	1,25	2,62E-04	1	
OWA53212.1	BV898_17645	QPCT	0,32	2,30	1,25	5,00E-03	1	
QQV21611.1	BV898_04511	SLC39A12	0,32	2,07	1,25	8,43E-03	1	
QQV19139.1	BV898_06777	VWA5A	0,32	2,04	1,25	9,09E-03	1	
OWA52059.1;OWA52058.1	BV898_16522	ABCB6	0,32	3,20	1,25	6,38E-04	1	
QQV21658.1	BV898_04233	USP9X	0,32	4,42	1,25	3,77E-05	1	
OWA50417.1	BV898_14934	GABARAP	0,31	2,70	1,24	2,01E-03	1	
QQV24012.1	BV898_01969	RAP2C	0,31	2,94	1,24	1,14E-03	1	
QQV23315.1	BV898_02763	BV898_02763	0,31	2,63	1,24	2,33E-03	1	Tardi
OWA50602.1	BV898_15113	ECE1	0,31	2,18	1,24	6,56E-03	1	
QQV14370.1	BV898_11351	SSBP1	0,30	2,21	1,23	6,13E-03	1	
QQV20931.1	BV898_05006	TDRD1	-0,31	2,34	0,81	4,53E-03	1	
OWA53415.1	BV898_17845	BV898_17845	-0,31	3,02	0,80	9,63E-04	1	Tardi
QQV18417.1;QQV18418.1	BV898_07620	PAPSS2	-0,32	2,85	0,80	1,40E-03	1	
QQV11570.1	BV898_14146	BV898_14146	-0,33	2,35	0,79	4,51E-03	1	Tardi
QQV13556.1	BV898_12193	HPGDS	-0,33	3,04	0,79	9,16E-04	1	
OWA54279.1;QQV19456.1	BV898_18687	BV898_18687	-0,35	3,89	0,79	1,29E-04	1	Tardi
QQV11805.1	BV898_13930	MAT1A	-0,35	3,41	0,78	3,87E-04	1	
QQV13779.1	BV898_11998	ADGRG4	-0,36	2,02	0,78	9,65E-03	1	
QQV11565.1	BV898_14141	BV898_14141	-0,36	3,02	0,78	9,53E-04	1	Tardi
QQV23456.1	BV898_02577	BV898_02577	-0,36	2,17	0,78	6,74E-03	1	Tardi
OWA52355.1	BV898_16810	RTF2	-0,37	2,55	0,77	2,80E-03	1	
OWA54035.1	BV898_18457	BV898_18457	-0,37	2,79	0,77	1,60E-03	1	Tardi

QQV16844.1	BV898_09016	CYP51A1	-0,38	2,31	0,77	4,85E-03	1	
QQV11534.1	BV898_14190	BV898_14190	-0,38	2,33	0,77	4,67E-03	1	Tardi
QQV20556.1	BV898_05378	PXDN	-0,40	2,84	0,76	1,46E-03	1	
OWA52280.1	BV898_16738	MRC1	-0,41	3,19	0,75	6,46E-04	1	
OWA53017.1	BV898_17454	BV898_17454	-0,41	3,34	0,75	4,54E-04	1	Tardi
QQV16355.1	BV898_09500	TOP3B	-0,42	3,48	0,75	3,33E-04	1	
QQV18722.1	BV898_07161	PLIN5	-0,43	2,85	0,74	1,42E-03	1	
QQV14435.1	BV898_11412	BRWD1	-0,44	2,73	0,74	1,84E-03	1	
QQV22042.1	BV898_03889	BV898_03889	-0,44	2,11	0,74	7,79E-03	1	Tardi
OWA49778.1	BV898_14315	BV898_14315	-0,48	2,15	0,72	7,04E-03	1	Tardi
QQV16467.1	BV898_09457	PDIA4	-0,48	2,79	0,72	1,63E-03	1	
QQV17453.1	BV898_08387	BV898_08387	-0,48	2,06	0,72	8,67E-03	1	Tardi
QQV25865.1	BV898_00014	FASN	-0,49	4,12	0,71	7,67E-05	1	
OWA50248.1	BV898_14771	CSTA	-0,49	2,18	0,71	6,62E-03	1	
QQV26072.1	BV898_00200	BV898_00200	-0,50	2,47	0,71	3,41E-03	1	Tardi
QQV21903.1	BV898_04116	EPX	-0,51	2,34	0,70	4,52E-03	1	
QQV11571.1;OWA53076.1	BV898_14147	BV898_14147	-0,51	3,50	0,70	3,16E-04	1	Tardi
QQV13873.1	BV898_11871	TGFBRAP1	-0,51	2,58	0,70	2,62E-03	1	
QQV16132.1	BV898_09767	TMEM63B	-0,52	4,61	0,70	2,43E-05	1	
QQV15613.1	BV898_10202	BV898_10202	-0,53	2,24	0,69	5,71E-03	1	Tardi
OWA49846.1	BV898_14383	DNASE1L3	-0,55	5,54	0,68	2,88E-06	1	
OWA52548.1	BV898_17000	TLL2	-0,56	5,06	0,68	8,65E-06	1	
OWA50364.1	BV898_14883	BV898_14883	-0,56	3,56	0,68	2,77E-04	1	Tardi
QQV13197.1	BV898_12521	BV898_12521	-0,56	3,60	0,68	2,51E-04	1	Tardi
QQV16687.1	BV898_09198	BV898_09198	-0,61	7,18	0,66	6,68E-08	1	Tardi
QQV18449.1	BV898_07459	PITPNA	-0,61	2,33	0,66	4,63E-03	1	
QQV24286.1	BV898_01827	PRDX1	-0,63	3,83	0,65	1,49E-04	1	
QQV25929.1	BV898_00071	PRSS55	-0,63	3,02	0,64	9,64E-04	1	
OWA50729.1	BV898_15236	BV898_15236	-0,67	3,42	0,63	3,79E-04	1	Tardi
QQV17882.1	BV898_08013	CTSB	-0,68	5,93	0,62	1,17E-06	1	
QQV14121.1	BV898_11696	BV898_11696	-0,71	2,75	0,61	1,77E-03	1	Tardi
QQV22958.1	BV898_03010	MRC2	-0,72	2,01	0,61	9,76E-03	1	
QQV24726.1	BV898_01318	BV898_01318	-0,72	2,14	0,61	7,23E-03	1	Tardi
QQV20756.1	BV898_05334	EPG5	-0,75	4,09	0,59	8,04E-05	1	
QQV18363.1;QQV22041.1	BV898_07566	BV898_07566	-0,78	2,95	0,58	1,12E-03	1	Tardi
QQV22628.1	BV898_03453	BV898_03453	-0,87	3,35	0,55	4,42E-04	1	Tardi
QQV24781.1	BV898_01371	WSCD2	-0,88	2,71	0,54	1,95E-03	1	
QQV12189.1	BV898_13531	TRRAP	-0,95	2,62	0,52	2,38E-03	1	
QQV21412.1	BV898_04621	NOP53	-1,03	4,24	0,49	5,76E-05	1	
OWA50339.1	BV898_14860	PROC	-1,08	2,52	0,47	3,05E-03	1	
QQV13364.1	BV898_12399	BV898_12399	-1,12	2,02	0,46	9,59E-03	1	Tardi
QQV18951.1	BV898_07010	CAV1	-1,19	2,25	0,44	5,67E-03	1	
OWA53314.1	BV898_17749	GTF2E1	-1,21	4,87	0,43	1,36E-05	1	
QQV24822.1;QQV24829.1;QQV24827.1	BV898_01416	PIF1	-1,80	2,70	0,29	1,99E-03	1	
OWA51956.1	BV898_16415	AMOT	-2,18	5,93	0,22	1,17E-06	1	

II. Résultats complémentaires

A. Caractérisation des propriétés de résistance de l'espèce *A. antarcticus*

Les résultats précédents ont montré qu'*A. antarcticus* était capable d'induire différentes voies de réparation en réponse aux dommages créés par les rayonnements ionisants ou le traitement à la bléomycine. Néanmoins, aucune donnée n'est actuellement disponible sur la résistance de cette espèce aux rayonnements ionisants. Afin de répondre à cette question, j'ai soumis des individus adultes à des doses croissantes de rayonnements γ allant de 100 à 5000Gy (débit de dose de 14Gy/min) (n=4). J'ai ensuite évalué la viabilité des tardigrades (sensibilité à la lumière et mouvement des pattes) à 24, 48, 72 et 96h. J'ai réalisé en parallèle le même protocole avec *H. exemplaris* (**Figure 1**), comme comparaison. Il avait été rapporté que *H. exemplaris* possédait une LD₅₀_{48h} de 4180Gy au rayonnements γ (Beltrán-Pardo et al. 2015).

Des doses de rayonnements γ jusqu'à 1000Gy n'affectent pas la survie d'*A. antarcticus* (**Figure 1 A**) (97% de survie) par rapport aux contrôles (100% de survie) quel que soit le temps post-irradiation. A partir de 2000Gy, la survie de *A. antarcticus* commence à diminuer (par ex pour 2000Gy : 92% de survie à 24h et 86% à 96h). Pour 5000Gy, la survie à 24h est de 89% et descend à 62% à 96h. Les doses utilisées ne sont pas suffisamment élevées pour affecter le taux de survie d'*A. antarcticus* de plus de 50%. Une extrapolation de la LD₅₀_{48h} nous a permis d'obtenir une valeur indicative située entre 5680Gy et 7680Gy (**Figure 1 C**). En comparaison, *H. exemplaris* (**Figure 1 B**) est affecté dès 500Gy et 72h post-irradiation (Survie de 91% à 72h post-irradiation et 87% à 96h) en comparaison des contrôles (97% de survie à 72h et 96h post-irradiation). L'impact négatif sur la survie augmente avec la dose pour atteindre seulement 33% de survie à 24h à 2000Gy et 13% à 96h. A partir de 4000Gy, la survie est nulle quel que soit le temps post-irradiation considéré. Ces résultats nous ont permis d'estimer une LD₅₀_{48h} de 1440Gy pour *H. exemplaris* (**Figure 1 C**). Cette valeur est très différente de celle précédemment publiée de 4180Gy (Beltrán-Pardo et al. 2015). Cela pourrait être dû notamment aux différences de conditions expérimentales et à la difficulté

de comparer les différentes études comme discuté dans l'introduction. Toutefois, nous pouvons conclure que *A. antarcticus* présente une bien plus grande résistance aux rayonnements γ que *H. exemplaris*.

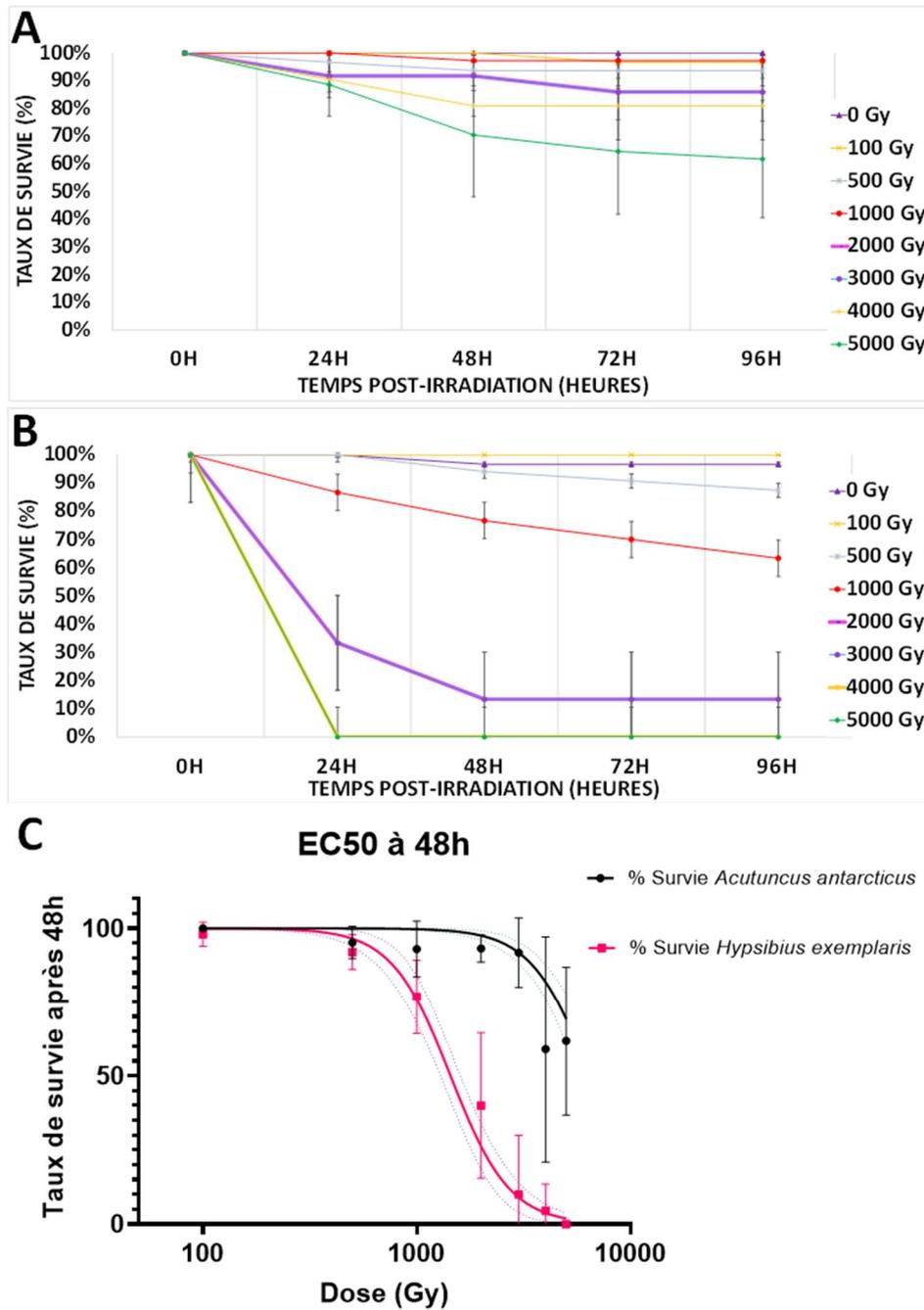


Figure 1 : Taux de survie de **(A)** *A. antarcticus* et **(B)** *H. exemplaris* adultes après exposition à différentes doses de rayonnements γ . Les barres d'erreur représentent les écarts types

(n= 3 ou n=2), pour la courbe de survie à 4000Gy de *A. antarcticus* ; expériences avec 10 animaux). **(C)** Estimation de la LD50_{48h} au rayonnement γ pour les 2 espèces.

B. Séquençage *de novo*, assemblage et annotation du génome d'*A. antarcticus*

Au même titre que *R. varieornatus* et par sa résistance aux UV, à la dessiccation (Horikawa et al. 2013), à la congélation (Tsujiimoto et al. 2020), *A. antarcticus* pourrait s'avérer être un modèle de tardigrade extrémotolérant plus intéressant ou complémentaire à *H. exemplaris*. Néanmoins, aucune donnée génomique ou transcriptomique n'est à ce jour publiée pour *A. antarcticus*.

Afin d'avoir une vision globale des gènes présents chez *A. antarcticus* et de pouvoir réaliser des analyses de génomique comparative avec d'autres espèces dont les ressources génomiques sont disponibles, mais aussi d'avoir à disposition des outils génomiques robustes pour étudier des acteurs moléculaires d'intérêt chez cette espèce, nous avons choisi de séquencer et assembler *de novo* le génome d'*A. antarcticus*.

Pour cela, nous avons mis en place la culture de *A. antarcticus* au laboratoire en partant d'un seul individu isolé et nous avons généré au bout de deux années d'élevage de larges populations de ce tardigrade. Ainsi, nous avons assez de biomasse pour réaliser un séquençage de qualité. Le séquençage a ainsi pu être réalisé par Dovetail Genomics, à partir de l'ADN extrait de 80 000 individus, pour s'assurer d'avoir une couverture et une profondeur de lecture élevées qui facilitent l'assemblage du génome (263X de couverture des lectures). Pour augmenter la précision et la contiguïté des contigs assemblés, des longues lectures avec un faible taux d'erreurs (longs reads PacBio HiFi de 15kB) ont été générées. Le scaffolding des contigs a été amélioré par le protocole Hi-Rise qui utilise la fréquence des contacts chromatinien de différentes régions et génère des paires de reads par ligation de proximité (Protocole Omni-C comparable au Hi-C). Avec cette approche un assemblage avec des scaffolds proches de l'échelle chromosomique a pu être obtenu.

L'assemblage généré fait 170 Mpb et contient 2013 scaffolds, avec un L50 de 6 (**Figure 1 A**). Cela signifie que les 6 contigs les plus longs couvrent 50% de la taille totale de l'assemblage. Ces 6 premiers scaffolds ont des tailles voisines allant de 13 817 017pb à 15 135 999pb et l'analyse de leur profil en k-mer (5mer) en analyse en composante principale montre des

profils similaires, différent de la majorité du reste des scaffolds (Exemple en **Figure 2 B** avec les scaffolds 6 et 7). Les différences de profils d'ACP entre scaffolds indiquent que certains contiennent des séquences contaminantes. Quelques rares scaffolds ont toutefois un profil en k-mer comparable aux 6 premiers scaffolds, suggérant qu'ils contiennent probablement des séquences d'*A. antarcticus* pas encore parfaitement assemblées.

Ces 6 scaffolds contenant plus de 50% de l'information génétique de l'assemblage, de tailles similaires et avec des profils différents nous suggèrent qu'ils pourraient être assemblés à un niveau proche de l'échelle chromosomique, en accord avec le fait que *A. antarcticus* possède 6 chromosomes ($n=6$) (Altiero et al. 2015). Toutefois, des caractérisations supplémentaires, comme la comparaison de la conservation de la synténie avec d'autres génomes de tardigrades proches et de bonne qualité comme celui d'*H. exemplaris* permettraient de confirmer cela.

L'assemblage contient aussi une part non négligeable de contaminations issues de l'ADN d'organismes procaryotes (Données supplémentaires: contamination par Scaffold sélection contigs). Par comparaison de séquences à la base de données nr de NCBI, certains scaffolds montrent jusqu'à 100% de similarité avec des séquences bactériennes. Les 6 premiers scaffolds ont été identifiés comme contenant entre 9 et 13% de séquences bactériennes. Par conséquent, une méthode de filtrage des scaffolds contaminés sur la base de ces données reste à faire afin d'éliminer les scaffolds entièrement bactériens de l'assemblage.

L'évaluation quantitative de la complétude du génome a été réalisée avec le programme BUSCO sur la base de données eucaryote (**Figure 2 C**) et indique que le génome d'*A. antarcticus* est complet à 93% avec un nombre de séquences dupliquées aux alentours de 30%. La complétude de ce nouveau génome est supérieure à ce qui a déjà été publié pour *H. exemplaris*, qui n'a toutefois que peu de duplication. Le taux élevé de duplication obtenu est sans doute dû à des séquences assemblées plusieurs fois sur différents scaffolds plutôt qu'à une réalité biologique.

Nous avons également réalisé une annotation du génome qui prédit 13 372 séquences codantes chez *A. antarcticus*, toutefois le nombre de gènes présents chez *H. exemplaris* est de l'ordre de 20 000 (Yoshida et al. 2017), ainsi il est probable que l'annotation soit incomplète. En effet, lorsque nous recherchons certains gènes d'intérêt comme AaDsup dans

l'annotation, nous ne le trouvons pas alors qu'il est retrouvé par comparaison de séquence avec la méthode de Blast (**Figure 3**). Nous devons donc affiner la stratégie de prédiction de gène afin de prédire plus de gènes et notamment les gènes uniques aux tardigrades que nous avons identifiés comme surexprimés suite à l'irradiation dans notre analyse transcriptomique.

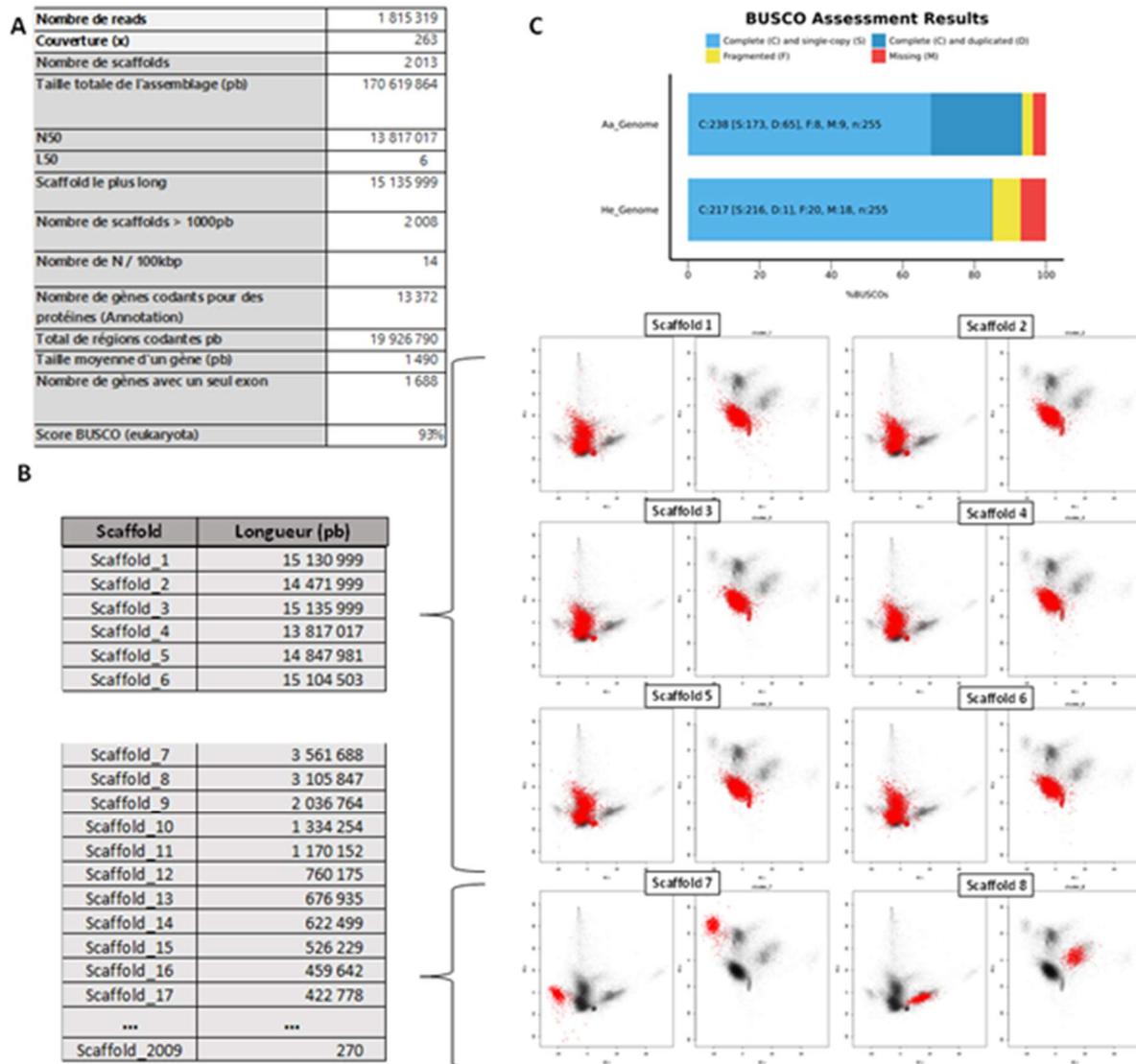


Figure 2 : (A) Métriques du génome de *Acutuncus antarcticus*. **(B)** Analyse en composantes principales selon les variables 1 et 2 (gauche) et 1 et 3 (droite) de l'analyse en 5mer des scaffolds après fragmentation en morceaux non chevauchants de 5kpb. Chaque point rouge représente un fragment de 5kb parmi l'ensemble du scaffold et chaque point noir représente

Figure 3 : Alignement de séquences obtenu avec T-COFFEE, (Version 11.00) de la protéine Dsup de *R. varieornatus* (RvDsup) et de ses orthologues putatifs de *H. exemplaris* (HeDsup) et *A. antarcticus* (AaDsup) ("*" indique un résidu parfaitement conservé ":" et "." indiquent des résidus appartenant à des groupes respectivement avec des propriétés fortement ou faiblement similaires). Les éléments rose foncé sont très fiables, tandis que les éléments bleus foncés et verts ne sont pas fiables d'après la base de données de T-Coffee. Les éléments encadrés sont soit des domaines conservés, se référer à la légende pour la signification des couleurs.

1. Identification d'un homologue de Dsup chez *A. antarcticus*

A partir du génome assemblé de *A. antarcticus* nous avons identifié une protéine homologue de RvDsup (29% d'identité) et de HeDsup (31% d'identité). HeDsup avait été initialement identifié sur la base d'une homologie faible avec RvDsup (26.4% d'identité) (Hashimoto et Kunieda, 2017) puis par analyse de la synténie (Chavez et al, 2019).

L'alignement des 3 protéines sur T-Coffee, montre que AaDsup possède des régions conservées, qui correspondent à des domaines fonctionnels décrits pour RvDsup et HeDsup, avec la conservation du domaine de liaison aux nucléosomes HMGN et la présence d'une séquence de localisation nucléaire en région C-Terminale de la protéine (Mínguez-Toral et al. 2020, Chavez et al. 2019). D'autres domaines conservés mais dont on ne connaît pas la fonction sont retrouvés (encadrés en gris/noir) et pourraient être des régions importantes pour l'activité de liaison à l'ADN / protectrice de Dsup. Nous avons identifié la présence d'un motif très conservé entre les 3 protéines, déjà décrit comme conservé entre HeDsup et RvDsup, que nous avons nommé KEK domain (**Figure 3** : très forte conservation entre RvDsup et HeDsup, et moins avec AaDsup).

2. HeDsup et AaDsup se localisent dans le noyau en cellules humaines U2OS

Afin de voir si tout comme RvDsup (Hashimoto et al. 2016), HeDsup et AaDsup se localisait bien dans le noyau , nous avons transfecté un plasmide exprimant la protéine de fusion

HeDsup-EGFP et AaDsup-EGFP en cellules humaines en culture (U2OS). Au bout de 48h, on observe une localisation nucléaire (colocalisation Hoechst / GFP) de toutes les protéines transfectées, par immunofluorescence, après avoir immunomarké la GFP avec un anticorps anti-GFP (**Figure 4 A**).

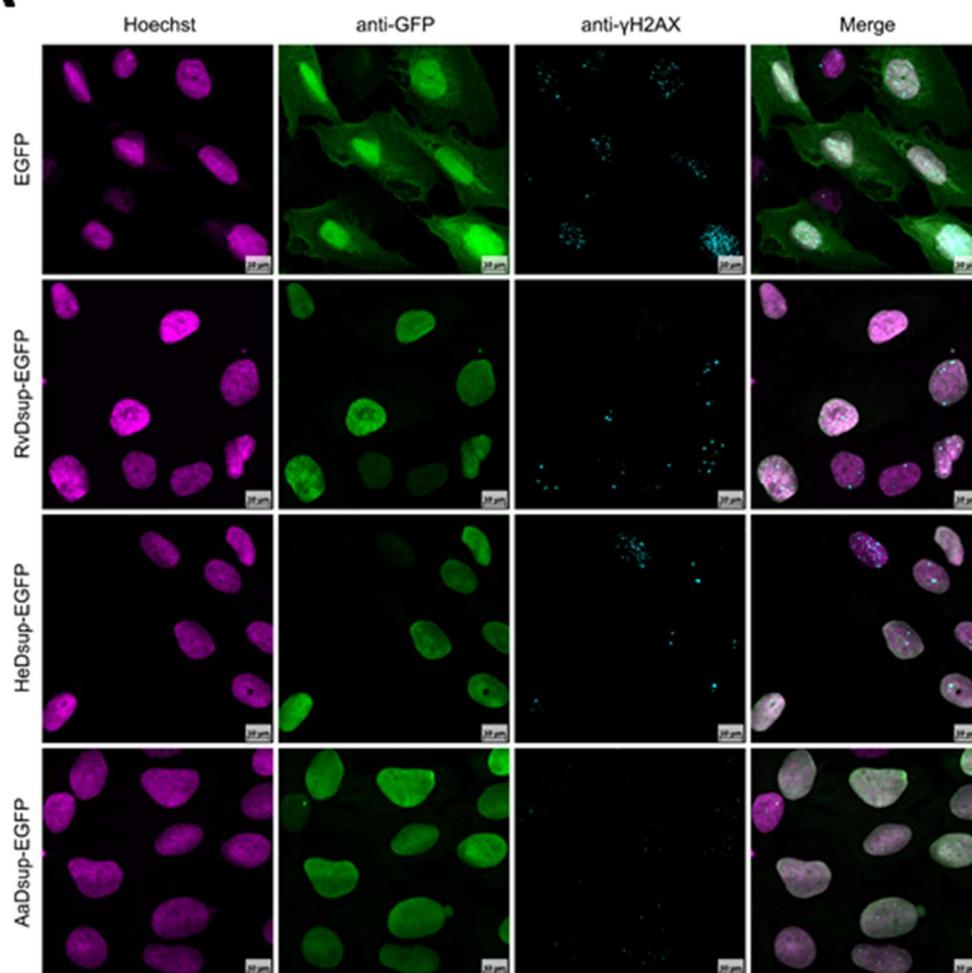
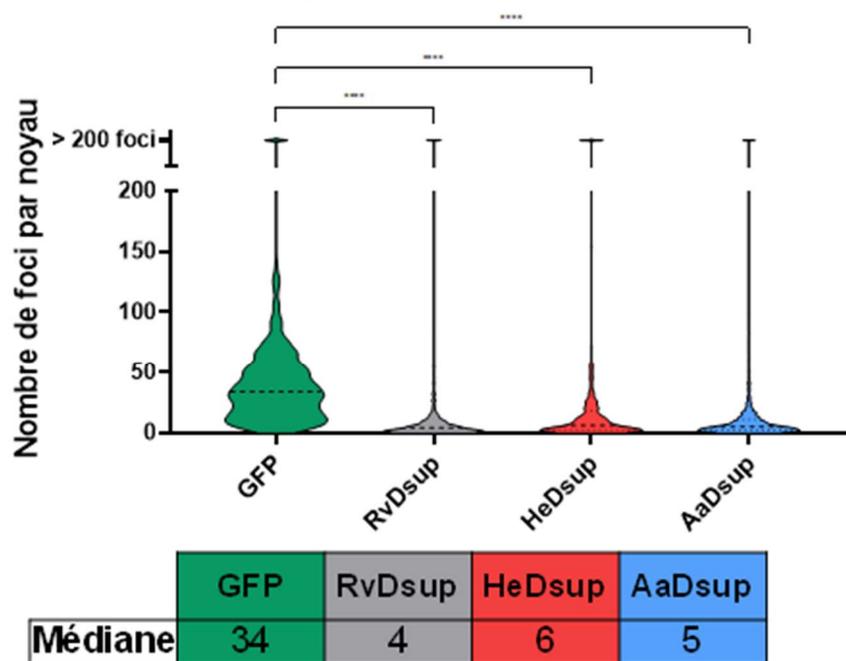
A**B**

Figure 4 : Diminution du nombre de foyers γ H2AX formés dans les noyaux de cellules humaines en culture transfectées avec un plasmide codant pour RvDsup-GFP, HeDsup-GFP ou AaDsup-GFP. (A) Analyse de la localisation subcellulaire des protéines de fusion Dsup-GFP (*R. varieronatus* (RvDsup), *H. exemplaris* (HeDsup), *A. antarcticus* (AaDsup)) par microscopie confocale à fluorescence. Les plasmides d'expression des protéines indiquées ont été électroporés dans des cellules U2OS. 2 jours plus tard, les cellules transfectées ont été traitées avec 10 μ g.ml⁻¹ de bléomycine pendant 1 heure, fixées avec une solution PFA PBS à 4% pendant 1h, immunomarquées avec des anticorps poulet anti-GFP et souris anti- γ H2AX. Un minimum de 580 noyaux ont été comptés pour chaque condition expérimentale selon une méthode décrite en détail en matériel et méthode complémentaire. **(B)** Représentation en violon plot de la distribution du nombre de foyers γ H2AX par noyau pour une expérience représentative (n=3). Le comptage des foci a été effectué sur des lignées cellulaires U2OS électroporées avec un plasmide exprimant la protéine EGFP seule (contrôle) ou une fusion du gène Dsup et de la GFP (Dsup-GFP) après un traitement à la bléomycine de 10 μ g.ml⁻¹. Dsup de *R. varieornatus* décrite à l'origine est nommé RvDsup tandis que HeDsup et AaDsup se réfèrent respectivement aux orthologues putatifs retrouvés chez *H. exemplaris* et *A. antarcticus* ****P<0.0001 (test de Kruskal-Wallis).

3. HeDsup et AaDsup diminuent le nombre de foyers γ H2AX en cellules humaines après traitement à la bléomycine

Nous avons également voulu vérifier si HeDsup et AaDsup confèrent une tolérance aux stress génotoxiques aux cellules humaines comme RvDsup (Hashimoto et al. 2016). Pour ceci nous avons regardé si l'expression transitoire de ces protéines avait un impact sur le nombre de foyers γ H2AX dans les noyaux de cellules humaines traitées à la bléomycine. Après transfection des plasmides Dsup-GFP de chacune des 3 espèces ou du plasmide exprimant la GFP seule, nous avons traité les cellules avec 10 μ g/mL de bléomycine pendant 1 heure. Cela nous a permis de visualiser par immunofluorescence le nombre de foyers γ H2AX au niveau nucléaire dans les cellules exprimant les différentes protéines Dsup. Comme montré dans la **figure 4 B**, HeDsup et AaDsup diminuent significativement le nombre de foyers γ H2AX, au même titre que RvDsup (médiane \leq 6 foyers / noyau) en comparaison du

contrôle GFP (médiane de 34 foyers/noyau). Cette activité, renforce l'hypothèse d'orthologie de AaDsup et HeDsup avec RvDsup.

En conclusion, nous avons identifié un orthologue potentiel de RvDsup chez *A. antarcticus* et validé en cellules humaines l'activité de HeDsup, étudiée jusqu'alors seulement *in vitro*.

4. Caractérisation de l'effet protecteur des mutants de RvDsup en cellules humaines (en cours)

RvDsup	MASTHQSSSTEPSSSTGKSEE TKK DASQSGSQD SKNVTVTKGTGSSATSAAI VKTGGSQGKDSSTTAGSSSTQG
RvDsupΔHMGN1	MASTHQSSSTEPSSSTGKSEE TKK DASQSGSQD SKNVTVTKGTGSSATSAAI VKTGGSQGKDSSTTAGSSSTQG
RvDsupΔKEK	MASTHQSSSTEPSSSTGKSEE TKK DASQSGSQD SKNVTVTKGTGSSATSAAI VKTGGSQGKDSSTTAGSSSTQG
RvDsup mutE KEK	MASTHQSSSTEPSSSTGKSEE TKK DASQSGSQD SKNVTVTKGTGSSATSAAI VKTGGSQGKDSSTTAGSSSTQG
RvDsup mutA KEK	MASTHQSSSTEPSSSTGKSEE TKK DASQSGSQD SKNVTVTKGTGSSATSAAI VKTGGSQGKDSSTTAGSSSTQG
Conservé	*****
RvDsup	QKFSTTPTDPKTFSSDQKEKSKSPAKE VPSGGDSKSSQGD TKSQSDAKSSGQSQGQSKDSGKSSSDSSKSHSV
RvDsupΔHMGN1	QKFSTTPTDPKTFSSDQKEKSKSPAKE VPSGGDSKSSQGD TKSQSDAKSSGQSQGQSKDSGKSSSDSSKSHSV
RvDsupΔKEK	QKFSTTPTDPKTFSSDQ-----PSSGGDSKSSQGD TKSQSDAKSSGQSQGQSKDSGKSSSDSSKSHSV
RvDsup mutE KEK	QKFSTTPTDPKTFSSDQEEEESEPAEE VPSGGDSKSSQGD TKSQSDAKSSGQSQGQSKDSGKSSSDSSKSHSV
RvDsup mutA KEK	QKFSTTPTDPKTFSSDQAEASASPAEE VPSGGDSKSSQGD TKSQSDAKSSGQSQGQSKDSGKSSSDSSKSHSV
Conservé	*****
RvDsup	IGAVKDVVAGAKDVAGKAVEDAPSI MHTAVD AVKNAATT VKDVASSAASTVAEKVV DAYH SVVGDKTDDKKE
RvDsupΔHMGN1	IGAVKDVVAGAKDVAGKAVEDAPSI MHTAVD AVKNAATT VKDVASSAASTVAEKVV DAYH SVVGDKTDDKKE
RvDsupΔKEK	IGAVKDVVAGAKDVAGKAVEDAPSI MHTAVD AVKNAATT VKDVASSAASTVAEKVV DAYH SVVGDKTDDKKE
RvDsup mutE KEK	IGAVKDVVAGAKDVAGKAVEDAPSI MHTAVD AVKNAATT VKDVASSAASTVAEKVV DAYH SVVGDKTDDKKE
RvDsup mutA KEK	IGAVKDVVAGAKDVAGKAVEDAPSI MHTAVD AVKNAATT VKDVASSAASTVAEKVV DAYH SVVGDKTDDKKE
Conservé	*****
RvDsup	GEHSGDKKDDSKAGSGSGGGDNKKSE GETSQAESSSGNEGAAP AKGRGRGRPPAAAKGVAKGAAKGAAS
RvDsupΔHMGN1	GEHSGDKKDDSKAGSGSGGGDNKKSE GETSQAESSSGNEGAAP AKGRGRGRPPAAAKGVAKGAAKGAAS
RvDsupΔKEK	GEHSGDKKDDSKAGSGSGGGDNKKSE GETSQAESSSGNEGAAP AKGRGRGRPPAAAKGVAKGAAKGAAS
RvDsup mutE KEK	GEHSGDKKDDSKAGSGSGGGDNKKSE GETSQAESSSGNEGAAP AKGRGRGRPPAAAKGVAKGAAKGAAS
RvDsup mutA KEK	GEHSGDKKDDSKAGSGSGGGDNKKSE GETSQAESSSGNEGAAP AKGRGRGRPPAAAKGVAKGAAKGAAS
Conservé	*****
RvDsup	KGAKSGAES SKGGEQSSGD IEMADASSKGGSDQRDSAAT VEGGASGSEGGAKKGRGRGAGKKADAGD TSAE
RvDsupΔHMGN1	KGAKSGAES SKGGEQSSGD IEMADASSKGGSDQRDSAAT VEGGASGSEGGAKKGRGRGAGKKADAGD TSAE
RvDsupΔKEK	KGAKSGAES SKGGEQSSGD IEMADASSKGGSDQRDSAAT VEGGASGSEGGAKKGRGRGAGKKADAGD TSAE
RvDsup mutE KEK	KGAKSGAES SKGGEQSSGD IEMADASSKGGSDQRDSAAT VEGGASGSEGGAKKGRGRGAGKKADAGD TSAE
RvDsup mutA KEK	KGAKSGAES SKGGEQSSGD IEMADASSKGGSDQRDSAAT VEGGASGSEGGAKKGRGRGAGKKADAGD TSAE
Conservé	*****
RvDsup	PPRRSSRLTSSGTGAGSAPAAAKGGAKRAASSSTPSNAKKQATGGAGKAAATKATAAKSAASKAPQNGAGA
RvDsupΔHMGN1	-----SSGTGAGSAPAAAKGGAKRAASSSTPSNAKKQATGGAGKAAATKATAAKSAASKAPQNGAGA
RvDsupΔKEK	PPRRSSRLTSSGTGAGSAPAAAKGGAKRAASSSTPSNAKKQATGGAGKAAATKATAAKSAASKAPQNGAGA
RvDsup mutE KEK	PPRRSSRLTSSGTGAGSAPAAAKGGAKRAASSSTPSNAKKQATGGAGKAAATKATAAKSAASKAPQNGAGA
RvDsup mutA KEK	PPRRSSRLTSSGTGAGSAPAAAKGGAKRAASSSTPSNAKKQATGGAGKAAATKATAAKSAASKAPQNGAGA
Conservé	*****
RvDsup	KKKGGKAGGRKRK
RvDsupΔHMGN1	KKKGGKAGGRKRK
RvDsupΔKEK	KKKGGKAGGRKRK
RvDsup mutE KEK	KKKGGKAGGRKRK
RvDsup mutA KEK	KKKGGKAGGRKRK
Conservé	*****

Figure 5: Alignement de séquences obtenu avec T-COFFEE, Version 11.00 de la protéine Dsup de *R. varieornatus* (RvDsup) et du mutant que nous avons conçu pour le tester. RvDsup Δ HMGN1 est supprimé du domaine HMGN1 ; RvDsup Δ KEK est supprimé du domaine KEK conservé, tandis que RvDsup mutE KEK et RvDsup mutA KEK contiennent respectivement une substitution K > E et K > A du domaine KEK. Les cadres cyan indiquent les régions mutées de chaque mutant testé. (" * " indique un résidu entièrement conservé ; " : " et " . " indiquent des sites appartenant à des groupes présentant des propriétés similaires fortes et faibles, respectivement). Les régions rose foncé sont très fiables, tandis que les régions bleus et verts sont peu fiables d'après la base de données de T-Coffee.

Pour caractériser le mécanisme d'action de RvDsup nous avons réalisé des mutants des domaines fonctionnels identifiés (**Figure 5**) et décrits plus haut en **Figure 3**. Les mutants réalisés sont :

- RvDsup avec une délétion du domaine HMGN de liaison aux nucléosomes
- RvDsup avec une délétion du premier motif conservé nommé KEK domain sur la **Figure 3**
- RvDsup avec une mutation des acides aminés K en A
- RvDsup avec une mutation des acides aminés K en E

Avec ces mutants nous souhaitons tester si le domaine HMGN1 de liaison au nucléosome et le domaine conservé "KEK domain" est important pour la fonction protectrice de RvDsup. Des mutants similaires ont été produits pour HeDsup et AaDsup, afin de tester les mêmes hypothèses.

Les expériences de caractérisation de l'effet protecteur des mutants en cellules humaines est en cours.

III. Matériel et méthode complémentaire : séquençage et assemblage du génome d'*Acutuncus antarcticus*

A. Préparation des échantillons et séquençage du génome d'*Acutuncus antarcticus*

~80 000 specimens d'*A. antarcticus* à l'état actif ont été culotés en tube eppendorf 1,5mL et congelés à -80°C avec le minimum d'eau puis envoyés à Dovetail Genomics LLC (Scotts Valley, Californie, Etats-Unis) qui ont réalisé la lyse, l'extraction d'ADN, le contrôle qualité, la préparation des banques et le séquençage PacBio CLR.

B. Assemblage de novo du génome d'*Acutuncus antarcticus* et annotation

1. Assemblage

Au total 26,3 gigabases de paires de reads ont été générés par séquençage et utilisées avec l'assembleur WTDBG2 v2.5 avec les paramètres suivants :

- Taille de génome : 0,1g
- Longueur minimum des reads : 20000
- Longueur minimum d'alignement : 8192
- Réalignement autorisé avec l'option -R
- Le type de lecture (read) a été programmé avec l'option -x sq

Des comparaisons entre l'assemblage réalisé par WTDBG2 et la base donnée nt de NCBI ont été faites par blast et données à blobtools v1.1.1 pour identifier les contigs contaminés (bactéries, plantes, champignons) et les éliminer de l'assemblage. Le programme purge_dups v1.2.3 a été utilisé pour retirer les haplotigs et les contigs redondants.

2. Annotation

Les familles de répétitions présentes dans les assemblages du génome d'*Acutuncus Antarcticus* ont été identifiées de novo et classées à l'aide du logiciel RepeatModeler (version 2.0.1). RepeatModeler est dépendant des programmes RECON (version 1.08) et RepeatScout (version 1.0.6) pour l'identification de novo des répétitions dans le génome. La banque de répétitions personnalisée obtenue de RepeatModeler a été utilisée pour détecter, identifier et masquer les répétitions dans le fichier d'assemblage en utilisant RepeatMasker (version 4.1.0). Les séquences codantes d'*Hypsibius exemplaris* et de *Ramazzottius varieornatus* ont été utilisées pour entraîner le modèle ab initio initial pour *Acutuncus Antarcticus* en utilisant le logiciel AUGUSTUS (version 2.5.5). Six cycles d'optimisation de la prédiction de gène ont été effectués avec le logiciel fourni par AUGUSTUS. Les mêmes séquences codantes ont également été utilisées pour entraîner un modèle ab initio distinct pour *A. antarcticus* en utilisant SNAP (version 2006-07-28). Les lectures RNAseq du transcriptome d'*A. antarcticus* ont été mappées sur le génome à l'aide du logiciel STAR aligner (version 2.7) et des indicateurs d'introns (intron hints) ont été générés avec les outils bam2hints du logiciel AUGUSTUS. MAKER, SNAP et AUGUSTUS (grâce aux limites intron-exon générées grâce au RNA-Seq) ont ensuite été utilisés pour prédire les gènes dans le génome de référence d'où les répétitions avaient été masquées. Pour aider à guider le processus de prédiction, les séquences peptidiques Swiss-Prot de la base de données UniProt ont été téléchargées et utilisées conjointement avec les séquences protéiques de *Hypsibius exemplaris* et *R. varieornatus* pour générer des preuves peptidiques (peptide evidence) dans le pipeline Maker. Seuls les gènes prédits à la fois par les logiciels SNAP et AUGUSTUS ont été retenus dans les sets de gènes finaux. Pour aider à évaluer la qualité de la prédiction des gènes, des scores AED ont été générés pour chacun des gènes prédits dans le cadre du pipeline MAKER. Les gènes ont été caractérisés pour leur fonction putative en effectuant une recherche BLAST des séquences peptidiques dans la base de données UniProt. Les ARNt ont été prédits à l'aide du logiciel tRNAscan-SE (version 2.05).

C. Préparation des banques Omni-C et séquençage Hi-C

Les contigs ont été regroupés par scaffold grâce à la méthode de Hi-C

La banque Omni-C a été préparée en utilisant le kit Dovetail™ Omni-C™ et le protocole du fabricant.

Pour chaque banque Dovetail Omni-C, la chromatine a été fixée dans le noyau avec du formaldéhyde puis extraite. La chromatine a ensuite été digérée avec la DNase I et les extrémités ont été réparées puis liguées à un adaptateur biotinylé. Les adaptateurs biotinylés à proximité l'un de l'autre ont été ligués (ligation de proximité) puis le crosslinking a été défait et l'ADN purifié. L'ADN purifié a été traité de manière à retirer la biotine qui n'était pas dans les fragments ligués. Les banques ont été générées en utilisant le kit NEBNext Ultra enzymes et des adaptateurs Illumina compatibles. Les fragments liés à la biotine ont été isolés grâce à des billes de streptavidine, puis chaque banque a été enrichie par PCR. Les banques ont été séquencées sur un séquenceur Illumina HiSeqX, avec des séquences ayant une couverture d'environ 30X.

D. Regroupement en scaffold de l'assemblage avec le protocole HiRise

Pour le scaffolding, le protocole HiRise a été utilisé avec des reads MQ>50. Ce protocole a été réalisé spécifiquement pour assembler des contigs en scaffolds à partir de données de séquençage issues de ligations de proximité (Putnam et al., 2016). L'assemblage *De novo* généré par WTBG2 et la banque Omni-C ont été utilisés pour le protocole. Les séquences de la banque Omni-C ont été alignées à l'assemblage issu de WTBG2 grâce au programme bwa (<https://github.com/lh3/bwa>). Les paires de lectures Omni-C qui ont mappé sur les

scaffolds ont été analysées par HiRise afin de définir un modèle de vraisemblance pour évaluer les distances entre paires de lectures. Ce modèle a été utilisé pour identifier et éliminer les points de contacts erronés, repérer des points de contact potentiels et les scorer afin de récupérer ceux qui satisfont les seuils de sélection requis.

Troisième chapitre : Discussion

A l'heure actuelle, beaucoup de questions restent à élucider concernant la réponse des tardigrades aux dommages à l'ADN. Le domaine reste peu étudié et il est très probable que les tardigrades aient acquis d'autres systèmes de protection et/ou de réparation que ceux décrits auparavant.

Par ailleurs, les études sur le tardigrade *A. antarcticus* sont très limitées, et les seules publiées s'intéressent à sa tolérance aux UV (Giovannini et al., 2018) et leur capacité antioxydantes face à la dessiccation (Giovannini et al., 2022). Aucune donnée génomique ou transcriptomique n'est pour le moment publiée chez cette espèce.

L'objectif de ce travail de recherche était d'avoir une vision d'ensemble sur l'importance de la protection et de la réparation de l'ADN chez les tardigrades, d'identifier des candidats potentiels uniques chez ces derniers et tester s'ils induisent une réduction des dommages de l'ADN dans des cellules humaines à la suite de stress génotoxiques.

Nous avons également souhaité caractériser la tolérance de *A. antarcticus* aux rayonnements ionisants et produire un génome annoté de qualité suffisante afin de posséder les outils génomiques qui nous permettraient de mieux caractériser les acteurs impliqués dans la tolérance aux stress génotoxiques de cette espèce.

Je discuterai dans un premier temps de l'impact des rayonnements ionisants sur le génome de *H. exemplaris* ainsi que la cinétique de réparation qui se met en place suite aux cassures générées dans son ADN, puis de la réponse globale aux dommages de l'ADN chez nos 3 espèces.

Dans un second temps, je discuterai du rôle de TDR1, gène unique aux tardigrades impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN, et proposerai des approches complémentaires pour approfondir la compréhension de sa fonction.

Dans un troisième temps, je discuterai de la forte tolérance d'*A. antarcticus* aux rayonnements ionisants en comparaison de *H. exemplaris* puis du nouvel orthologue potentiel de Dsup découvert chez cette espèce.

Enfin, j'aborderai des questionnements plus généraux sur la survie et la forte tolérance des tardigrades. Puis je finirai sur les perspectives soulevées par ce travail de recherche et une conclusion générale.

I. La réponse aux dommages de l'ADN chez les eutardigrades

A. Impact des rayonnements ionisants sur le génome de *H. exemplaris* et cinétique de réparation de l'ADN

Ces travaux montrent qu'en réponse à des doses élevées de rayonnements ionisants (100 Gy et 1000 Gy de rayonnements γ), *H. exemplaris* subit des CSB dans son ADN détectée dès 30 minutes post-irradiation en électrophorèse sur gel d'agarose en conditions dénaturantes. Pour une dose de 1000Gy, on observe l'apparition d'un smear sur le gel et la perte de la bande majoritaire de haut poids moléculaire (>20kb) qui correspond à l'ADN génomique. Une bande minoritaire plus discrète est présente entre 10 et 20kb et suit la même cinétique de disparition / réapparition que la bande majoritaire. L'origine de cette bande est inconnue, mais pourrait éventuellement être d'origine mitochondriale.

Ce phénomène est maximal entre 4h30 et 8h post-irradiation, puis diminue à partir de 24h pour atteindre un aspect comparable au contrôle au bout de 72h. L'analyse de la taille des fragments d'ADN simple brin à 30 min post-irradiation nous permet d'estimer qu'il y a 1 CSB tous les 10-20kb chez *H. exemplaris*.

Les résultats obtenus aux deux doses de rayonnements montrent une tendance similaire, mais le phénomène de dégradation est moins visible à 100Gy qu'à 1000Gy, suggérant un effet de dégradation dose-dépendant de la dose de rayonnement utilisée.

En conclusion, *H. exemplaris* subit un nombre de cassure massif dans son ADN suite à l'exposition à de fortes doses de rayonnements γ et semble réparer complètement son ADN entre 24h et 72h post-irradiation.

En mesurant les CDB en faisant migrer l'ADN de *H. exemplaris* post-irradiation sur gel d'agarose en condition native, on n'observe pas de dégradation de l'ADN. Ces résultats semblent être en contradiction avec l'impact connu des rayonnements γ sur l'ADN. Néanmoins, avec un taux de CDB équivalent à ce qui a été mesuré dans des cellules humaines, pour une dose de 1000 Gy, on s'attendrait à induire une CDB/200 kpb. La taille des fragments induits avec ce taux de CDB ne peut pas être résolue dans le gel d'agarose utilisé. De plus, l'extraction d'ADN, en elle même, produit une fragmentation de l'ADN et dans les conditions actuelles, les fragments obtenus sont de taille bien inférieurs à 200 kpb pour des animaux non-irradiés. En ce sens, il serait intéressant nécessaire d'essayer de faire une électrophorèse en champ pulsé pour détecter la présence de CDB. Une exposition à des doses élevées de rayonnements γ chez le rotifère *A. vaga* montre l'apparition de CDB après migration de leur ADN génomique par électrophorèse en champ pulsé (Gladyshev and Meselson, 2008).

Quoi qu'il en soit, nous avons détecté indirectement l'apparition de CDB dans l'ADN en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine γ H2AX de *H. exemplaris* qui est phosphorylée en réponse à l'apparition de ce type de cassures. Après irradiations aux mêmes doses de rayonnements ionisants de *H. exemplaris* et extraction protéique des individus irradiés, une phosphorylation du variant d'histone est détectée par immunoblot dès 30 min post-irradiation, avec une réponse maximale entre 4h30 et 8h post-irradiation et une diminution du marquage progressive dès 24h post-irradiation. La diminution du marquage γ H2AX signifie qu'il y a une diminution du nombre de CDB avec le temps et suggère que *H. exemplaris* exhibe une réponse de réparation aux CDB, qui se traduit par une phosphorylation H2AX suite à une fragmentation de son génome.

La cinétique de réparation semble indiquer que *H. exemplaris* peut survivre pendant plusieurs heures (réparation complète entre 24 et 72 post-irradiation) avec de nombreuses CDB dans son génome.

La cinétique de phosphorylation de H2AX est similaire à la cinétique de réparation des dommages dans l'ADN de *H. exemplaris*. Ainsi, nous montrons pour la première fois que *H. exemplaris* survit et répare l'ADN endommagé par les rayonnements gamma et qu'une partie des dommages réparés passe par les voies de réparation des CDB avec la phosphorylation du variant d'histone H2AX.

B. Une réponse conservée aux cassures double-brin chez les tardigrades

Après avoir montré que *H. exemplaris* subissait et réparait les dommages induits dans son génome par des rayonnements γ , nous avons voulu regarder globalement l'expression génique. Les 3 espèces de tardigrades traitées aux rayonnements γ ou à la bléomycine montrent une surexpression massive de nombreux gènes de réparation des cassures double brin en réponse aux deux types de traitements. Cette réponse transcriptomique est corrélée chez *H. exemplaris* à une réponse protéique similaire, renforçant les résultats obtenus dans l'analyse différentielle des transcriptomes. La discussion suivante est basée sur des données de transcriptomiques dans lesquelles les transcrits sont identifiés par homologies de séquence. Ainsi, j'ai conscience que les hypothèses émises sur l'absence de certains acteurs de la réparation sont à prendre avec précaution et nécessitent confirmation par l'étude de génomes complets ou des expériences de biologie fonctionnelle directement sur les tardigrades.

1. Une surexpression massive et conservée des gènes du c-NHEJ

Nos données montrent la surexpression de nombreux gènes du c-NHEJ. En particulier, on observe une forte surexpression des gènes XRCC5 et XRCC6 en réponse aux stress génotoxiques induits chez nos 3 espèces. Ces deux gènes du c-NHEJ codent pour les protéines Ku80 et Ku70, qui forment un hétérodimère essentiel pour stabiliser les extrémités de la CDB. La surexpression de ces protéines a été confirmée par l'analyse d'extraits

protéiques d'*H. exemplaris* irradiés à 1000Gy ou traités à la bléomycine. Cette analyse a été réalisée par immunoblot avec des anticorps que nous avons générés spécifiquement pour cibler les protéines Ku70 et Ku80 de *H. exemplaris*. L'enzyme de libération des extrémités PNKP est également surexprimée chez les 3 espèces. Enfin la Ligase 4 qui permet la ligation des extrémités dans la dernière étape du c-NHEJ montre elle aussi une forte surexpression. Dans le cas des CDB provoquées par irradiation, le traitement des extrémités endommagées par PNKP ou par Artemis peut induire des mutations dans le génome, ainsi cela signifie que le recours massif au c-NHEJ chez le tardigrade pourrait donner lieu à l'apparition de mutations dans le génome de ces animaux. Par conséquent, il est possible que les animaux irradiés, bien qu'ils réparent leur ADN, soient affectés sur le long terme.

En effet, la perte éventuelle de gènes importants pourrait diminuer leur adaptation et celle de leur descendance. Cette hypothèse pourrait être testée en séquençant la descendance pour évaluer le taux de d'indel en comparaison de colonies normales.

2. Une réponse aux CDB conservée pour les acteurs essentiels de la RH et du MMEJ mais pas des gènes de la résection

La recombinaise RAD51, protéine caractéristique de la RH qui permet l'invasion du brin homologue, est surexprimée chez les 3 espèces en accord avec ce qui avait été montré en expression protéique chez *M. inceptum*, un eutardigrade de l'ordre Apochela (Beltrán-Pardo et al., 2013b). L'histone Macro-H2A1 est également fortement surexprimée. Il a été montré que cette histone réprime l'ouverture de la chromatine et favorise la RH (Khurana et al. 2014). Toutefois, la protéine BRCA2 semble absente chez les tardigrades. Ce médiateur central de la RH, est essentiel pour stabiliser la recombinaise RAD51 au niveau du site de cassure (Shahid et al., 2014). Son absence pourrait suggérer l'existence d'autres acteurs de recrutement de Rad51 chez les tardigrades.

Nos résultats montrent une forte surexpression du gène POLQ chez les 3 espèces. Cette protéine joue le rôle de polymérase-hélicase et est un acteur central du MMEJ (Mateos-

Gomez et al. 2015). Néanmoins la Ligase 3, acteur majeur de cette voie, est absente chez les tardigrades. Son absence pourrait toutefois être supplée par la ligase 1 qui elle est largement sur-exprimée dans les 3 espèces en réponse aux dommages induits.

MRE11, protéine du complexe MRN impliquée dans l'initiation de la résection montre une forte surexpression chez *A. antarcticus* et *P. fairbanksi*, mais pas chez *H. exemplaris*. Si MRE11, joue un rôle dans la radiotolérance des tardigrades, alors l'absence de surexpression de MRE11 chez *H. exemplaris* pourrait éventuellement expliquer sa plus faible tolérance aux rayonnements gamma par rapport à celle de *A. antarcticus*. Une hypothèse similaire avait d'ailleurs été suggérée avec l'exemple de *R. varieornatus* qui est plus résistant que *H. exemplaris* aux UV et à la dessiccation que *H. exemplaris*. Les auteurs avaient suggéré que cela pourrait en partie s'expliquer par le fait que MRE11 est présent en 4 copies chez *R. varieornatus* contre une seule chez *H. exemplaris* (Hashimoto et al. 2016; Yoshida et al. 2017; Carrero et al., 2019).

La protéine NBS1, aussi impliquée dans le complexe MRN, n'est retrouvée chez aucun des tardigrades étudiés, ni dans les données génomiques publiées d'autres tardigrades. Cela pourrait suggérer que NBS1 est remplacé par un autre acteur dans le complexe MRN. Néanmoins, c'est aussi possible qu'il existe bien une protéine NBS1 chez les tardigrades mais que sa séquence n'est pas suffisamment conservée pour être identifiée par BLAST. Dans ce sens, une protéine NBS1 a bien été caractérisée chez *C. elegans*. Cette protéine interagit bien avec MRE11 et RAD50 mais son homologie de séquence avec les protéines NBS1 identifiées précédemment n'est pas suffisante pour une identification par BLAST. La protéine Rad50, dernier acteur du complexe, est retrouvée mais n'est surexprimée chez aucune des 3 espèces. Cette divergence entre la surexpression de MRE11 et Rad50, ainsi que l'absence de NBS1 interroge sur le fonctionnement et le rôle de ce complexe dans la réponse aux dommages.

CtIP joue également un rôle crucial dans la résection et interagit avec MRN. Bien que présent chez tous les eucaryotes, ce gène avait été décrit comme absent chez *H. exemplaris* et *R. varieornatus* (Kamilari et al., 2019). Cependant, nous avons trouvé un homologue putatif fortement surexprimé aux stress génotoxiques induits chez *H. exemplaris*. Un homologue est

également retrouvé chez *A. antarcticus* et *P. fairbanksi*, mais il n'est pas surexprimé en réponse aux stress que nous avons induits. Enfin, nous avons trouvé un homologue dans le génome publié de *R. varieornatus*. Bien qu'elle soit forte, l'homologie de séquence entre ces protéines et le CtIP de *C. elegans* (Sae2), *D. melanogaster* ou *H. sapiens* est limitée à un domaine caractéristique de CtIP (Sae2/RBBP8 domain), ce qui pourrait expliquer les difficultés pour identifier cette protéine chez les tardigrades. Il serait nécessaire d'approfondir les études sur ce gène afin de confirmer ou non l'orthologie entre ce gène et CtIP.

De manière générale, des études fonctionnelles pourraient apporter des réponses plus concrètes quant à l'importance de chaque acteur mentionné précédemment dans la réponse aux CDB chez les tardigrades. Par exemple en isolant et identifiant les partenaires des protéines par Co-IP et spectrométrie de masse et en comparant la radiotolérance de lignées de tardigrades KO pour ces gènes grâce au système CRISPR/Cas9.

3. Réparation des cassures simple brin chez les tardigrades

Les gènes du BER XRCC1, Lig1, PARP2 et PARP3 sont également surexprimés dans toutes les conditions testées et chez les 3 espèces. Les rayonnements ionisants génèrent des clusters de sites apurinique/apyrimidique (ou site AP) avec un ratio de 1 DSB pour 1,5 cluster de sites AP en cellules de mammifères (Sutherland et al., 2003) et il est attendu que le BER soit impliqué dans leur réparation (Robertson et al., 2009). Cela suggère que les dommages aux bases et les CSB sont bien réparés par le mécanisme du BER chez les tardigrades.

D'autre part, RNF146 est communément et fortement surexprimée en réponse aux dommages induits. Il a été montré que cette E3 ubiquitine ligase poly(ADP-ribose) dépendante de (PAR) (aussi appelée Iduna) facilitait la réparation de l'ADN par excision des bases alkylées, probablement par l'association (PAR)-dépendante et l'ubiquitination d'acteurs clés tels que PARP1, PARP2, XRCC1 et l'ADN ligase 3 chez l'Homme qui permet de les envoyer vers la voie du protéasome pour dégradation (Kang et al., 2011). On pourrait faire l'hypothèse que la surexpression de RNF146 pourrait s'expliquer par la nécessité d'un fort turn-over de protéines de réparation pour traiter le grand nombre de cassures de l'ADN. Ainsi ce fort turn-over permettrait de moduler l'accès aux sites de cassures aux différents acteurs de la réparation, en libérant au fur et à mesure les sites pour laisser la place aux acteurs suivants des voies de réparation.

4. Absence de la protéine ATM: quelles voies de détection des CDB?

En amont de ces voies, l'initiation de la réponse aux dommages double-brin semble être différente chez les tardigrades, en raison de l'impossibilité d'identifier un homologue d'ATM chez ces derniers. Cette kinase, normalement recrutée par le complexe MRN, joue un rôle dans la régulation de la réponse aux CDB en phosphorylant des cibles, comme H2AX en γ H2AX, qui participent au recrutement d'autres protéines de la réparation et de contrôle du cycle cellulaire.

Pourtant, cette absence d'ATM est contradictoire avec la réponse aux CDB médiée par la phosphorylation de γ H2AX chez *H. exemplaris* et l'accumulation de la protéine Macro-H2A1. En effet, il a été montré que Macro-H2A1 était dépendante de l'activité de ATM en cellules humaines (Khurana et al. 2014). Cela pourrait indiquer l'existence d'un ATM très divergent chez les tardigrades et/ou l'existence de voies de régulations de la réponse aux CDB différentes chez les tardigrades comme un remplacement par la kinase ATR, une autre kinase impliquée dans la détection des dommages à l'ADN.

C. Des gènes uniques aux tardigrades pour pallier aux dommages

Parmi tous les gènes surexprimés de manière commune chez les 3 espèces, il y a 108 gènes pour lesquels nous n'avons retrouvé aucun homologue chez *C. elegans*, *D. melanogaster* ou chez l'Homme. Ce qui suggère que nombre d'entre eux sont des gènes uniques aux tardigrades et pourraient jouer un rôle dans la tolérance des tardigrades aux rayonnements ionisants. Certains sont des gènes de tardigrades déjà caractérisés comme l'AMNP («Anhydrobiosis-related Mn-dependent peroxidase»). Cette protéine fait partie d'une famille de peroxydases uniques aux tardigrades présente chez les deux classes de tardigrades (Eutardigrada et Heterotardigrada). Elle a été initialement découverte chez *R. varieornatus* en analysant les gènes communément surexprimés en réponse à l'anhydrobiose et aux UVC (Yoshida et al., 2022). Sa surexpression chez nos 3 espèces suggère éventuellement qu'elle pourrait aussi avoir un rôle dans la détoxification aux ERO induits par les rayonnements ionisants ou la bléomycine.

Parmi les candidats potentiels impliqués dans la tolérance aux dommages à l'ADN, nous avons identifié un gène inconnu très surexprimé en réponse aux rayonnements γ chez les 3 espèces, il est également surexprimé dans les transcriptomes réalisés en réponse à la bléomycine (*H. exemplaris* / *A. antarcticus*). Ce gène est le plus surexprimé des gènes inconnus dans quasiment toutes les conditions et toutes espèces confondues.

Nous l'avons nommé TDR1 (pour Tardigrade DNA Damage Response 1). La forte surexpression d'homologues conservés de *HeTDR1* (TDR1 de *H. exemplaris*) chez *A. antarcticus* et *P. fairbanksi* nous a conduit à penser que ces gènes sont des orthologues, qui prennent respectivement le nom de AaTDR1 et PftDR1.

1. TDR1, un gène présent chez les eutardigrades de l'ordre Parachela

En plus d'être présent chez les 3 espèces étudiées, on retrouve TDR1 chez tous les tardigrades de l'ordre Parachela dont les données génomiques et transcriptomiques sont disponibles publiquement, sauf chez *R. varieornatus*. Son absence chez ce dernier pourrait toutefois provenir d'un génome incomplet et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer sa réelle absence. Nous n'avons pas trouvé de trace d'homologues de ce gène chez les hétérotardigrades de l'ordre Echiniscoidea (*E. sigismundi* et *E. testudo*). Sur la base de ces données, TDR1 semble être conservé tant chez les superfamilles Macrobiotioidea que Hypsibiodea. Cela pourrait suggérer que ce gène est apparu chez les Parachela, et si son absence est avérée chez *R. varieornatus*, cela pourrait éventuellement provenir d'une perte secondaire.

Des recherches supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer son existence chez l'autre ordre des eutardigrades. Nous n'avons pas identifié pour le moment la présence de TDR1 chez *M. inceptum* (Milnesiidae), seul Apochela dont les données transcriptomiques sont publiées à l'heure actuelle.

2. HeTDR1 se localise dans le noyau des tardigrades et interagit avec l'ADN *in vitro*

En injectant chez *H. exemplaris* un plasmide exprimant HeTDR1-GFP sous promoteur de l'actine de *H. exemplaris* (HeActin), en microscopie confocale à épifluorescence on observe une localisation de HeTDR1-GFP au niveau nucléaire avec une expression majoritairement musculaire comme attendu en raison de la spécificité pour les cellules musculaires du promoteur HeActin utilisé. Cette localisation spécifiquement nucléaire de la protéine TDR1 est retrouvée en cellules humaines par expression transitoire de plasmides codant pour TDR1-GFP sous promoteur CMV. Ce résultat est systématiquement retrouvé pour tous les TDR1 testés (ceux de *H. exemplaris*, *A. antarcticus*, *P. richtersi* et *R. coronifer*). Cette

localisation renforce l'idée que TDR1 interagit avec l'ADN et pourrait avoir un rôle dans la tolérance aux dommages à l'ADN chez les tardigrades.

La séquence prédite de cette protéine suggère qu'elle possède 4 hélices alpha et de nombreux acides aminés chargés positivement qui pourraient lui permettre d'interagir avec l'ADN. Cette hypothèse est étayée par des expériences de gel-retard où la protéine TDR1 recombinante a été mise en présence d'oligonucléotides simples ou double-brin marqués par une sonde fluorescente. La protéine semble interagir avec l'ADN de manière non spécifique, comme suggéré pour Dsup (Chavez et al., 2019). Toutefois, au-delà d'une certaine concentration le signal fluorescent n'est plus détectable, ce qui suggère un quenching de la sonde ou la formation d'agrégats de TDR1-ADN qui ne peuvent migrer sur le gel. Des expériences de microscopie nous ont permis de visualiser des agrégats.

3. HeTDR1 diminue le nombre de dommages dans l'ADN après irradiation

Nous avons utilisé γ H2AX comme indicateur de cassures double-brin en cellules humaines après transfection d'un plasmide de fusion TFR1-GFP sous contrôle d'un promoteur CMV. Ainsi nous avons montré que l'expression transitoire de la protéine TDR1-GFP en cellules U2OS traitées à la bléomycine diminuait le nombre de foyers γ H2AX générés en comparaison de cellules transfectées avec un plasmide exprimant la GFP seule. Ce résultat est observé pour tous les TDR1 testés (*H. exemplaris*, *A. antarcticus*, *P. richtersi* et *R. coronifer*) et corrobore l'importance de cette protéine dans la tolérance contre les dommages à l'ADN. De manière complémentaire, il serait également intéressant de mesurer si TDR1 est capable d'améliorer la survie des cellules aux rayonnements γ / bléomycine après transfection du plasmide TDR1-GFP.

4. Quel mécanisme pour TDR1?

En l'état, nos expériences d'expression de TDR1 dans des cellules humaines ne permettent pas de trancher entre un effet protecteur ou un effet d'amélioration de la réparation de l'ADN par TDR1. Pour répondre à cette question, on pourrait réaliser une mesure de l'état de l'ADN et de sa réparation en fonction du temps. Si TDR1 améliore l'efficacité de la réparation, alors on verra une amélioration de l'état de l'ADN avec le temps dans les cellules exprimant TDR1 en comparaison des cellules ne l'exprimant pas. S'il a un effet protecteur, le taux de dommages à l'ADN sera toujours plus faible que dans les conditions contrôles. Ces cinétiques seraient sans doute aussi plus précises si au lieu d'utiliser la Bléomycine, on irradiait les cellules aux rayons X.

Enfin, réaliser des expériences de génétique fonctionnelle chez le tardigrade serait la manière la plus directe de valider l'importance de TDR1 dans la tolérance des tardigrades aux stress génotoxiques. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la génération de lignées de tardigrades KO pour TDR1. En effet, après exposition à des doses croissantes de rayonnements ionisants, on pourrait mesurer la survie et donc la LD50 des lignées KO pour TDR1 en comparaison de lignées wild-Type. De la même manière on pourrait aussi mesurer et comparer le niveau de dégradation de leur ADN après exposition aux rayonnements ionisants. Néanmoins des développements sont encore nécessaires pour pouvoir réaliser de telles lignées puisque l'utilisation du système CRISPR/Cas9 ne permet pas encore de réaliser des mutants dans la lignée germinale chez les tardigrades (Kumagai et al. 2022).

Il serait également intéressant de révéler les acteurs protéiques interagissant avec TDR1. Nous pourrions identifier ses partenaires potentiels chez le tardigrades par des expériences de co-immunoprécipitation en utilisant l'anticorps anti-HeTDR1, que nous avons développé, pour isoler les partenaires potentiels de HeTDR1 et les identifier par spectrométrie de masse. Bien que dans nos expériences d'interaction in vitro, la fixation de TDR1 soit indépendante de la séquence d'ADN, des expériences de CHIP-seq pourraient permettre de voir si elle interagit préférentiellement avec certains types de séquence dans le contexte génomique (hétérochromatine, euchromatine, ...).

II. Propriété de résistance aux rayonnements ionisants chez *Acutuncus antarcticus*

A. Acutuncus antarcticus, un tardigrade très radiotolérant

Les tests de survie aux rayonnements gamma réalisés sur *A. antarcticus* ne nous ont pas permis de déterminer une LD50 jusqu'à 96h post-irradiation. La dose de 5000 Gy de rayonnements gamma n'est en effet pas suffisante pour tuer 50% des individus, suggérant que *A. antarcticus* est extrêmement radio-tolérant. Notre estimation de la LD50_{48h} par un modèle de courbe dose réponse (avec un facteur de Hill situé entre -4,108 to -2,541) nous a permis d'obtenir une valeur indicative située entre 5680Gy et 7680Gy. La valeur la plus élevée rapportée à ce jour étant une LD50_{24h} de 5700Gy pour *P. areolatus* (May et al. 1964), suggérant que *A. antarcticus* est potentiellement aussi radiotolérant face aux rayonnements à faible LET que cette espèce à l'état actif. Des caractérisations supplémentaires de la radiotolérance seraient nécessaires en augmentant les doses afin de pouvoir estimer de manière fiable une LD50.

Etonnamment, les taux de survie de *H. exemplaris* aux rayonnements gamma mesurés dans nos expériences sont bien inférieurs à ce qui avait été rapporté dans de précédentes études. La LD50_{48h} rapportée dans la littérature est de 4180 Gy (Beltran-Pardo 2015). A partir de nos données, nous estimons que *H. exemplaris* a une LD50_{48h} de 1440 Gy. Comme dit en introduction de ce manuscrit, cette importante différence de LD50_{48h} souligne la difficulté de comparer les LD50 obtenues dans les différentes études. Elles peuvent être affectées en particulier, par l'état des tardigrades utilisés (affamés ou venant d'être nourris), le moment où ils sont nourris après irradiation, le débit de dose utilisé pour l'irradiation ainsi que le stress lié au transport ou le volume d'eau présent au moment de l'irradiation (distance à la source). Nous en concluons donc que *H. exemplaris* est effectivement très radiotolérant, mais

comparativement moins que d'autres espèces de tardigrades et en particulier *A. antarcticus*, bien plus tolérant dans les mêmes conditions expérimentales.

Au même titre que *R. varieornatus*, *A. antarcticus* pourrait s'avérer être un modèle de tardigrade extrêmotolérant complémentaire à *H. exemplaris* pour comprendre les mécanismes de radiotolérance des tardigrades. Pour une analyse comparative, il serait également intéressant de voir s'il existe des espèces de tardigrades ayant perdu la radiorésistance. En particulier, il serait intéressant de tester la radiorésistance d'espèces exclusivement aquatiques qui ne supportent pas la dessiccation (comme par exemple *Thulinus ruffoi* (Kondo et al., 2020)).

B. Confirmation du rôle protecteur de HeDsup en cellule humaine et de l'orthologue potentiel de Dsup chez *A. antarcticus* (AaDsup)

1. Un nouvel orthologue de Dsup chez *A. antarcticus*?

Nous avons retrouvé un orthologue potentiel de Dsup chez *A. antarcticus* que nous avons nommé AaDsup. Il présente de nombreuses homologues de séquence avec RvDsup et HeDsup. Le domaine HMGN de liaison aux nucléosomes et la séquence de localisation nucléaire sont retrouvés dans la région C-Terminale de AaDsup comme montré par Mínguez-Toral et al. 2020 dans HeDsup et RvDsup. Dans cette même étude, il avait été rapporté l'existence de 2 motifs très conservés et l'hypothèse a été faite qu'ils pourraient jouer un rôle de "switch" conformationnel entre la forme désordonnée de Dsup et sa forme d'interaction avec l'ADN (Mínguez-Toral et al. 2020). Le premier motif, que nous avons nommé "KEK domain" en raison des acides aminés caractéristiques de ce motif, est très conservé chez les 3 espèces, bien que la conservation soit légèrement moins bonne chez AaDsup. Ainsi, cette conservation suggère qu'il pourrait avoir un rôle essentiel dans le fonctionnement de Dsup. Nous avons également trouvé de nouveaux motifs conservés en

ajoutant AaDsup à l'alignement. Il serait alors pertinent d'étudier la relation entre la structure et la fonction de Dsup, notamment en étudiant ces domaines.

Le second motif mentionné par Mínguez-Toral et al. 2020 (respectivement position 262-275 et 214-228 dans RvDsup et HeDsup) chargé positivement n'est pas retrouvé dans AaDsup, suggérant que ce motif n'est pas essentiel au fonctionnement de AaDsup. Et si AaDsup est effectivement orthologue aux deux autres Dsup, alors ce motif n'est peut-être pas essentiel au fonctionnement de Dsup.

2. HeDsup et AaDsup sont nucléaires et confèrent un effet protecteur contre les CDB induites par la bléomycine en cellules humaines

L'expression transitoire de plasmides codant pour les protéines HeDsup et AaDsup fusionnées à la GFP en cellules U2OS montre une localisation nucléaire des 3 protéines comme montré auparavant pour RvDsup (Hashimoto et al., 2016). Il avait également été montré que RvDsup diminuait le nombre de foyers γ H2AX de cellules humaines en comparaison de cellules non transfectées après traitement avec des rayons X (Hashimoto et al., 2016). Nous confirmons les résultats retrouvés pour RvDsup après un traitement à la bléomycine et nous montrons pour la première fois un effet similaire de HeDsup en cellules humaines. Nos résultats montrent également un effet diminution du nombre de foyers γ H2AX le nouvel orthologue potentiel AaDsup. Des études de viabilité cellulaire en réponse à la bléomycine ou aux rayonnements ionisants après transfection de HeDsup ou AaDsup pourraient compléter ces résultats.

C. Assemblage et annotation du génome d'*A. antarcticus*

Afin d'avoir des outils plus robustes pour caractériser la tolérance de *A. antarcticus* aux stress génotoxiques, nous avons séquencé son génome. Nous avons désormais à disposition un génome avec un assemblage de bonne qualité. Les 6 premiers scaffolds semblent concorder avec les chromosomes d'*A. antarcticus*. Un filtrage des scaffolds contaminés par des gènes bactériens reste à réaliser. Un premier modèle de prédiction de gènes a permis d'annoter 13 372 séquences codantes, mais cela reste inférieur au nombre de séquences codantes estimées chez *H. exemplaris*. Ainsi une amélioration de l'annotation en affinant le modèle de prédiction des gènes est nécessaire pour compléter ce travail.

D. Perspectives à court terme pour caractériser Dsup et exploiter le génome d'*A. antarcticus*

1. Caractérisation supplémentaires des orthologues de Dsup

Il serait intéressant d'étudier les domaines conservés entre les 3 orthologues potentiels de Dsup.

Avec le test fonctionnel en cellules humaines que nous avons développé, nous pourrions "disséquer" et tester l'importance de chaque domaine conservé dans l'effet protecteur de Dsup, en mutant et/ou supprimant séquentiellement ces régions conservées. Nous avons pour le moment réalisé des expériences préliminaires de délétion / mutation du domaine HMGN et du domaine KEK qui n'ont pas été présentées dans ce manuscrit. Ensuite, l'approche développée pour utiliser le système CRISPR/Cas9 chez *H. exemplaris* pourrait être adaptée à *A. antarcticus* et *R. varieornatus* pour étudier l'importance de Dsup chez ces 3 espèces. Pour avoir assez d'animaux pour étudier la radiorésistance, il faudrait disposer de lignées d'animaux mutants, ce qui nécessitera de réussir à modifier la lignée germinale (Kumagai et al., 2022).

2. Analyse comparative des voies conservées et perdues chez les tardigrades

L'un des objectifs de ce travail de thèse était initialement de réaliser une analyse comparative du génome d'*A. antarcticus* avec celui des autres espèces de tardigrades. L'objectif de cette analyse est de réaliser un catalogue des gènes communément présents chez les tardigrades concernant la réparation de l'ADN, la réponse à la dessiccation et au stress oxydatif. Cette comparaison sera réalisée à partir de toutes les données transcriptomiques et génomiques de tardigrades obtenues. Ce travail nous permettra de mettre en évidence des événements de spéciation et d'adaptation par acquisition ou perte de certaines voies biologiques chez les différents clades de tardigrades.

III. Questionnements généraux sur l'adaptation des tardigrades et leur radiotolérance

A. Des systèmes de réparation de l'ADN très fidèles ?

Afin de vérifier leur capacité à maintenir leur génome intact après réparation, il serait intéressant d'isoler des individus après irradiation afin de générer de nouvelles populations « clonales » à partir d'un oeuf descendant de l'individu irradié. Ensuite, en séquençant les populations clonales issues de cet oeuf et en les comparant entre elles et avec des populations clonales issues d'oeufs normaux, on pourrait observer et mesurer la divergence entre les séquences génomiques et mesurer le taux de mutation, ainsi que la présence réarrangement chromosomiques par Chromosome Conformation Capture (Hi-C). Cette expérience pourrait également être réalisée entre deux populations clonales non soumises

à des agents mutagènes, afin de mesurer le taux de mutation naturel de ces animaux et donc estimer la divergence allélique.

Une possibilité pour limiter l'accumulation de mutations dans des gènes essentiels pourrait être simplement expliquée par un très faible taux de mutation. Nous savons que les tardigrades accumulent des dommages à l'ADN suite à l'entrée en forme anhydrobiotique (Neumann et al., 2009) et nous avons montré qu'ils subissent des dommages suite à stress génotoxiques. Ainsi, leurs mécanismes de protection de l'ADN ne sont pas suffisants pour expliquer un faible taux de mutation. Ce phénomène pourrait être maintenu par un système très efficace et fidèle de réparation de l'ADN. Toutefois, la surexpression massive de gènes du c-NHEJ en réponse aux stress génotoxiques suggère que la réparation chez les tardigrades n'est pas assurément conservatrice, comme l'a montré également la réparation de CDB générées par le système CRISPR/Cas9 (Kumagai et al. 2022). Enfin, un haut taux de conversion génique, comme décrit chez certains rotifères, pourrait permettre le rétablissement de gènes essentiels qui auraient muté.

Toutefois, la plupart des tardigrades décrits sont soit diploïdes, soit triploïdes, écartant la possibilité de compléter les gènes perdus par la présence de nombreuses copies comme observé chez les rotifères (Flot et al., 2013). Il n'y a cependant aucune étude qui rapporte le taux de conversion génique chez les tardigrades, et cela pourrait être une piste pour expliquer le maintien de l'asexualité chez ces animaux.

B. Une tolérance supérieure aux rayonnements à haut TEL ?

Les rayonnements à haut TEL sont bien plus dommageables pour la survie et l'ADN à dose égale que les rayonnements à faible TEL (M. Anderson, 2000). Ces rayonnements génèrent majoritairement des CDB en comparaison des rayonnements à faible à TEL qui eux génèrent majoritairement du stress oxydatif (Respectivement ~90% des dommages générés contre ~20% des dommages générés) (Hagiwara et al., 2019; Mavragani et al., 2019). Ainsi, on

s'attendrait chez les tardigrades à observer une survie diminuée face aux rayonnements à haut TEL en comparaison de rayonnements à faible TEL. Pourtant les données de survie des tardigrades aux rayonnements ionisants, montre qu'ils tolèrent mieux les rayonnements à haut TEL qu'à faible TEL chez *M. inceptum* et *R. coronifer* (Horikawa et al. 2006 ; Nilsson et al. 2010).

Cela pourrait suggérer que les tardigrades sont plus résistants aux dommages occasionnés sur leur ADN et notamment aux CDB qu'aux autres dommages générés par le stress oxydatif. En effet, le stress oxydatif en plus de générer des dommages dans l'ADN, génère des dommages protéotoxiques et aux lipides. Cela pourrait alors signifier que que les tardigrades présentent une vulnérabilité relativement plus forte aux stress protéotoxiques et sur leurs lipides qu'aux dommages à l'ADN. Il a par ailleurs été montré que *H. exemplaris* accumule de la carbonylation protéique persistante en réponse aux UV et qu'elle était un marqueur d'âge (Kuzmic et al. 2018). Ainsi, il se pourrait que les systèmes de décarbonylation protéique soient un « talon d'Achille » chez ces animaux. Afin de vérifier cette hypothèse, on pourrait soumettre des échantillons d'espèces de tardigrades radiotolérantes à des doses similaires de rayonnements à haut TEL et faibles TEL, puis mesurer leur taux de survie, leur fécondité et leur fertilité. Cela permettrait d'acquérir des données comparatives sur la tolérance d'une même population d'individus à différents types de rayonnements. Ensuite, il serait intéressant de relier ces performances phénotypiques à des effets mesurables aux niveaux cellulaire et moléculaire. Par exemple en mesurant la dégradation de leur ADN (CSB et CDB), la carbonylation de leurs protéines et la peroxydation des lipides. La peroxydation des lipides est un processus au cours duquel des radicaux libres peuvent retirer des électrons aux lipides, produisant des intermédiaires réactifs qui peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules. Les membranes cellulaires, en raison de leur forte teneur en lipides, sont particulièrement sensibles aux rayonnements ionisants. La peroxydation des lipides qu'elles contiennent peut alors altérer leur structure et entraîner des lésions et la mort cellulaire (Kiang et al. 2012).

C. Survie à des doses massives de dommages : pertes de voies de réponse aux stress ?

Dans notre étude, nous avons montré que *H. exemplaris* montrait des CSB sur son génome suite à des doses massives de rayonnements γ et qu'il pouvait prendre plusieurs jours à reconstituer un génome comparable à celui de tardigrades non irradiés. Pourtant des doses élevées de rayonnements ionisants induisent rapidement la mort cellulaire (Eriksson and Stigbrand, 2010), ainsi cela suggère que les tardigrades peuvent retarder ou éviter la mort cellulaire en attendant de réparer les dommages de leur ADN. Ceci pourrait être rendu possible par la perte de certaines voies de réponse aux stress. En effet, il a été montré par génomique comparative que 5 espèces de tardigrades (*R. varieornatus*, *H. exemplaris*, *E. sigismundi*, *R. coronifer* et *E. testudo*; (Murai et al., 2021) montrent une perte du gène Gadd45 qui est une protéine exprimée de manière ubiquitaire et souvent induite en réponse aux dommages à l'ADN et associée avec l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose (Salvador et al., 2013). Elles manquent également du gène de la Sestrine qui est une cible induite par p53 en réponse aux stress génotoxiques et connecte les voies de réponse aux stress génotoxiques aux voies de signalisation par mTOR (Budanov and Karin, 2008). Le fait que ces gènes soient absents chez des eutardigrades et des hétérotardigrades suggère que ces orthologues ont été perdus avant la divergence entre les deux classes. L'analyse en génomique comparative de *H. exemplaris* et *R. varieornatus* (Hashimoto et al., 2016a) indique également une absence du gène REDD1 qui est aussi une cible de p53 en réponse aux stress génotoxiques. REDD1 est connecté à la voie mTOR par les gènes TSC1/TSC2, qui peuvent aussi être activés par les stress oxydatifs et qui manquent également chez les deux tardigrades (Zhang et al., 2013). La voie de signalisation mTOR est impliquée dans le contrôle de l'apoptose et de l'autophagie (Castedo et al., 2002; Deleyto-Seldas and Efeyan, 2021). L'absence des gènes qui relie la voie de signalisation mTOR aux voies de signalisation des stress génotoxiques et oxydatifs pourrait alors permettre de limiter les processus de mort cellulaire en attendant la réparation des dommages dans l'ADN. Cela corroborerait avec le fait que l'anhydrobiose génère des dommages dans l'ADN des tardigrades et qu'il faille

regarder la mort cellulaire à la sortie de la forme anhydrobiotique pour avoir le temps de réparer les dommages.

Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse était d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la protection et la réparation de l'ADN chez les tardigrades qui pourraient expliquer leur extraordinaire tolérance aux stress génotoxiques. Nos résultats indiquent que les tardigrades subissent des dommages dans leur ADN en réponse à des stress génotoxiques induits par les rayonnements ionisants et qu'ils possèdent une réponse conservée de certaines voies de réparation de l'ADN (c-NHEJ, RH et BER) pour répondre aux dommages causés.

Ils mettent également en jeu un ensemble d'acteurs protéiques uniques aux tardigrades, dont le candidat TDR1, conservé chez de nombreux tardigrades de l'ordre Parachela, que nous avons identifié comme interagissant avec l'ADN et conférant un effet protecteur en réponse à la bléomycine en cellules humaines. Par ailleurs, nous avons réalisé et annoté le génome du tardigrade *A. antarcticus*. Ce génome est complet et utilisable, mais nécessite des étapes de décontamination supplémentaires. Ceci nous a permis d'identifier un potentiel orthologue de Dsup chez *A. antarcticus* qui confère une protection contre les dommages générés par la bléomycine en cellules humaines. Ce résultat a également été démontré pour HeDsup, renforçant l'idée qu'ils sont des orthologues de RvDsup qui ont un rôle essentiel dans la protection du génome des tardigrades considérés. Enfin nous avons montré que cette espèce extrêmement résistante aux rayonnements ionisants en comparaison de l'espèce déjà très résistante *H. exemplaris*. Pour toutes ces raisons *A. antarcticus* semble être une nouvelle espèce modèle de choix pour étudier la résistance aux stress génotoxiques chez les tardigrades.

Avec l'acquisition du nouveau génome de *A. antarcticus* nous souhaitons réaliser un catalogue des gènes communément présents ou perdus chez les différents clades de tardigrades dont les données génomiques et transcriptomiques sont disponibles. Cela nous permettra d'acquérir une vision d'ensemble des acteurs moléculaires que les tardigrades peuvent mettre en jeu pour résister aux stress génotoxiques et à la dessiccation. Enfin nous

souhaitons caractériser davantage la fonction et les mécanismes de TDR1 et Dsup en cellules humaines en mutant les domaines conservés de ces protéines, mais aussi chez l'animal grâce au développement récent de la technique d'édition du génome CRISPR/Cas9 chez *H. exemplaris*.

Bibliographie

- Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A., 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489–493. <https://doi.org/10.1038/387489a0>
- Alligand, B., 2015. Étude du rôle des phosphorylations de Rad51 en Y54 et en Y315 sur son fonctionnement (These de doctorat). Nantes.
- Alpert, P., 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J. Exp. Biol.* 209, 1575–1584. <https://doi.org/10.1242/jeb.02179>
- Alpert, P., 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol.* 45, 685–695. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.685>
- Altiero, T., Giovannini, I., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2015. Life history traits and reproductive mode of the tardigrade *Acutuncus antarcticus* under laboratory conditions: strategies to colonize the Antarctic environment. *Hydrobiologia* 761, 277–291. <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2315-0>
- Altiero, T., Rebecchi, L., Bertolani, R., 2006. Phenotypic variations in the life history of two clones of *Macrobotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Hydrobiologia* 558, 33–40. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1403-y>
- Altiero, T., Suzuki, A.C., Rebecchi, L., 2018. Reproduction, development and life cycles, in: Schill, R.O. (Ed.), *Water Bears: The Biology of Tardigrades*, Zoological Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 211–247. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_8
- Ammermann, D., 1967a. Die cytologie der parthenogenese bei dem tardigraden *Hypsibius dujardini*. *Chromosoma* 23, 203–213. <https://doi.org/10.1007/BF00331113>
- Ammermann, D., 1967b. Cytology of parthenogenesis in the tardigrade *Hypsibius dujardini*.
- Anchordoguy, T.J., Carpenter, J.F., Cecchini, C.A., Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1990. Effects of protein perturbants on phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 356–361. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90654-H](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90654-H)
- Arakawa, K., 2022. Examples of extreme survival: tardigrade genomics and molecular anhydrobiology. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 10, 17–37. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083711>
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 327, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
- Balloux, F., Lehmann, L., de Meeûs, T., 2003. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164, 1635–1644. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1635>
- Barazzuol, L., Jeggo, P.A., 2016. In vivo sensitivity of the embryonic and adult neural stem cell compartments to low-dose radiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 57, i2–i10. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw013>
- Bartels, D., Salamini, F., 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. a contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiol.* 127, 1346–1353. <https://doi.org/10.1104/pp.010765>
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A.A., 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148, 6–24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
- Battista, J.R., 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 203–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.203>
- Bertolani, R., 2001. Evolution of the reproductive mechanisms in tardigrades — a review. *Zool. Anz. - J. Comp. Zool.* 240, 247–252. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00032>
- Bertolani, R., Guidetti, R., Marchioro, T., Altiero, T., Rebecchi, L., Cesari, M., 2014. Phylogeny of Eutardigrada: New molecular data and their morphological support lead to the identification of new evolutionary lineages. *Mol. Phylogenet. Evol.* 76, 110–126. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.006>
- Bétermier, M., Bertrand, P., Lopez, B.S., 2014. Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLOS Genet.* 10, e1004086. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004086>

- Billi, D., Potts, M., 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* 153, 7–12. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01279-7](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01279-7)
- Birky, C.W.Jr., Gilbert, J.J., 1971. Parthenogenesis in rotifers: the control of sexual and asexual reproduction. *Am. Zool.* 11, 245–266. <https://doi.org/10.1093/icb/11.2.245>
- Birky-Jr, C.W., 1996. Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* 144, 427. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.1.427>
- Bonifacio, A., Guidetti, R., Altiero, T., Sergo, V., Rebecchi, L., 2012. Nature, source and function of pigments in tardigrades: in vivo raman imaging of carotenoids in *Echiniscus blumi*. *PLoS ONE* 7, e50162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050162>
- Boothby, T.C., Pielak, G.J., 2017. Intrinsically disordered proteins and desiccation tolerance: elucidating functional and mechanistic underpinnings of anhydrobiosis. *BioEssays* 39, 1700119. <https://doi.org/10.1002/bies.201700119>
- Boothby, T.C., Tapia, H., Brozena, A.H., Piszkiwicz, S., Smith, A.E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G.J., Koshland, D., Goldstein, B., 2017. Tardigrades use intrinsically disordered proteins to survive desiccation. *Mol. Cell* 65, 975–984.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>
- Brown, C.J., Johnson, A.K., Dunker, A.K., Daughdrill, G.W., 2011. Evolution and disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.02.005>
- Bryndová, M., Stec, D., Schill, R.O., Michalczyk, Ł., Devetter, M., 2020. Dietary preferences and diet effects on life-history traits of tardigrades. *Zool. J. Linn. Soc.* 188, 865–877. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz146>
- Budanov, A.V., Karin, M., 2008. P53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134, 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.028>
- Budd, G.E., 2001. Tardigrades as ‘stem-group arthropods’: the evidence from the cambrian fauna. *Zool. Anz. - J. Comp. Zool.* 240, 265–279. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00034>
- Bunting, S.F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C.-X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J.M., Nussenzweig, A., 2010. 53BP1 inhibits homologous recombination in BRCA1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012>
- Bussau, C., 1992. New deep-sea Tardigrada (Arthrotardigrada, Halechiniscidae) from a manganese nodule area of the eastern South Pacific. *Zool. Scr.* 21, 79–92. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.1992.tb00311.x>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Campbell, L.I., Rota-Stabelli, O., Edgecombe, G.D., Marchioro, T., Longhorn, S.J., Telford, M.J., Philippe, H., Rebecchi, L., Peterson, K.J., Pisani, D., 2011. MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 15920–15924. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105499108>
- Campos, F., Cuevas-Velazquez, C., Fares, M.A., Reyes, J.L., Covarrubias, A.A., 2013. Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archeae and bacteria domains. *Mol. Genet. Genomics* 288, 503–517. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0768-2>
- Campos-Melo, D., Hawley, Z.C.E., Droppelmann, C.A., Strong, M.J., 2021. The integral role of RNA in stress granule formation and function. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.
- Cannavo, E., Cejka, P., 2014. Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within MRE11–Rad50–Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* 514, 122–125. <https://doi.org/10.1038/nature13771>
- Carrero, D., Pérez-Silva, J.G., Quesada, V., López-Otín, C., 2019. Differential mechanisms of tolerance to extreme environmental conditions in tardigrades. *Sci. Rep.* 9, 14938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51471-8>
- Castedo, M., Ferri, K.F., Kroemer, G., 2002. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ.* 9, 99–100. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400978>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D’Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol., Special Issue: Quality Control* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>

- Chakrabortee, S., Boschetti, C., Walton, L.J., Sarkar, S., Rubinsztein, D.C., Tunnacliffe, A., 2007. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18073–18078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706964104>
- Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., Boulton, S.J., 2013. RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol. Cell* 49, 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.002>
- Chavez, C., Cruz-Becerra, G., Fei, J., Kassavetis, G.A., Kadonaga, J.T., 2019. The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals. *eLife* 8, e47682. <https://doi.org/10.7554/eLife.47682>
- Chen, J., Ghorai, M.K., Kenney, G., Stubbe, J., 2008. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.* 36, 3781–3790. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn302>
- Chiruvella, K.K., Liang, Z., Wilson, T.E., 2013. Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012757. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012757>
- Clausen, L.K.B., Andersen, K.N., Hygum, T.L., Jørgensen, A., Møbjerg, N., 2014. First record of cysts in the tidal tardigrade *Echiniscoides sigismundi*. *Helgol. Mar. Res.* 68, 531–537. <https://doi.org/10.1007/s10152-014-0409-0>
- Clegg, J.S., 2001. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 128, 613–624. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00300-1](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00300-1)
- Criteria, I. of M. (US) C. on B.R.E., Johnson, J.C., Thaul, S., 1997. Principles of radiation protection, an evaluation of radiation exposure guidance for military operations: Interim report. National Academies Press (US).
- Crowe, J.H., 2008. Trehalose and anhydrobiosis: the early work of J. S. Clegg. *J. Exp. Biol.* 211, 2899–2900. <https://doi.org/10.1242/jeb.012476>
- Crowe, J.H., 1972. Evaporative water loss by tardigrades under controlled relative humidities. *Biol. Bull.* 142, 407–416. <https://doi.org/10.2307/1540318>
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.003051>
- Crowe, J.H., Madin, K. a. C., 1975. Anhydrobiosis in nematodes: Evaporative water loss and survival. *J. Exp. Zool.* 193, 323–333. <https://doi.org/10.1002/jez.1401930308>
- Crowe, L.M., 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 131, 505–513. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00503-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00503-7)
- Czernekova, M., Jönsson, K.I., 2016. Mitosis in storage cells of the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 888–896. <https://doi.org/10.1111/zoj.12440>
- Czernekova, M., Vinopal, S., 2021. The tardigrade cuticle. *Limnol. Rev.* 21, 127–146. <https://doi.org/10.2478/limre-2021-0012>
- Das, S., Carmona, A., Khatua, K., Porcaro, F., Somogyi, A., Ortega, R., Datta, A., 2019. Manganese mapping using a fluorescent Mn²⁺ sensor and nanosynchrotron X-ray fluorescence reveals the role of the golgi apparatus as a manganese storage site. *Inorg. Chem.* 58, 13724–13732. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01389>
- de Jager, T.L., Cockrell, A.E., Du Plessis, S.S., 2017. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species, Ultraviolet light in Human Health, Diseases and Environment, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 15–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
- Degma, P., Bertolani, R., Guidetti, R., 2023. Actual checklist of Tardigrada species. https://doi.org/10.25431/11380_1178608
- Degma, P., Bertolani, R., Guidetti, R., 2019. Actual checklist of Tardigrada species. https://doi.org/10.25431/11380_1178608
- Deleyto-Seldas, N., Efeyan, A., 2021. The mTOR–autophagy axis and the control of metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.

- Deng, W., Henriët, S., Chourrout, D., 2018. Prevalence of mutation-prone microhomology-mediated end joining in a chordate lacking the c-NHEJ DNA repair pathway. *Curr. Biol.* 28, 3337–3341.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.048>
- Douki, T., Court, M., Sauvaigo, S., Odin, F., Cadet, J., 2000. Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 275, 11678–11685. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11678>
- Duan, M., Speer, R.M., Ulibarri, J., Liu, K.J., Mao, P., 2021. Transcription-coupled nucleotide excision repair: New insights revealed by genomic approaches. *DNA Repair* 103, 103126. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103126>
- Dynan, W.S., Yoo, S., 1998. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 26, 1551–1559. <https://doi.org/10.1093/nar/26.7.1551>
- Edgecombe, G.D., 2010. Arthropod phylogeny: An overview from the perspectives of morphology, molecular data and the fossil record. *Arthropod Struct. Dev., Fossil Record and Phylogeny of the Arthropoda* 39, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2009.10.002>
- Edgecombe, G.D., Giribet, G., Dunn, C.W., Hejnol, A., Kristensen, R.M., Neves, R.C., Rouse, G.W., Worsaae, K., Sørensen, M.V., 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Org. Divers. Evol.* 11, 151–172. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0044-4>
- Eriksson, D., Stigbrand, T., 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol.* 31, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tkáč, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., Xu, D., Durocher, D., 2013. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol. Cell* 49, 872–883. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>
- Eyres, I., Boschetti, C., Crisp, A., Smith, T.P., Fontaneto, D., Tunnacliffe, A., Barraclough, T.G., 2015. Horizontal gene transfer in bdelloid rotifers is ancient, ongoing and more frequent in species from desiccating habitats. *BMC Biol.* 13, 90. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0202-9>
- Faria, J.M.R., Buitink, J., van Lammeren, A.A.M., Hilhorst, H.W.M., 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J. Exp. Bot.* 56, 2119–2130. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri210>
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant - Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Fischer, C., Ahlrichs, W.H., Buma, A.G.J., van de Poll, W.H., Bininda-Emonds, O.R.P., 2013. How does the ‘ancient’ asexual *Philodina roseola* (Rotifera: Bdelloidea) handle potential UVB-induced mutations? *J. Exp. Biol.* 216, 3090–3095. <https://doi.org/10.1242/jeb.087064>
- Fleming, J.F., Arakawa, K., 2021. Systematics of Tardigrada: A reanalysis of tardigrade taxonomy with specific reference to Guil et al. (2019). *Zool. Scr.* 50, 376–382. <https://doi.org/10.1111/zsc.12476>
- Flot, J.-F., Hespeels, B., Li, X., Noel, B., Arkhipova, I., Danchin, E.G.J., Hejnol, A., Henrissat, B., Koszul, R., Aury, J.-M., Barbe, V., Barthélémy, R.-M., Bast, J., Bazykin, G.A., Chabrol, O., Couloux, A., Da Rocha, M., Da Silva, C., Gladyshev, E., Gouret, P., Hallatschek, O., Hecox-Lea, B., Labadie, K., Lejeune, B., Piskurek, O., Poulain, J., Rodriguez, F., Ryan, J.F., Vakhrusheva, O.A., Wajnberg, E., Wirth, B., Yushenova, I., Kellis, M., Kondrashov, A.S., Mark Welch, D.B., Pontarotti, P., Weissenbach, J., Wincker, P., Jaillon, O., Van Doninck, K., 2013. Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature* 500, 453–457. <https://doi.org/10.1038/nature12326>
- Förster, F., Beisser, D., Grohme, M.A., Liang, C., Mali, B., Siegl, A.M., Engelmann, J.C., Shkumatov, A.V., Schokraie, E., Müller, T., Schnölzer, M., Schill, R.O., Frohme, M., Dandekar, T., 2012. Transcriptome analysis in tardigrade species reveals specific molecular pathways for stress adaptations. *Bioinforma. Biol. Insights* 6, 69–96. <https://doi.org/10.4137/BBI.S9150>
- Förster, F., Liang, C., Shkumatov, A., Beisser, D., Engelmann, J.C., Schnölzer, M., Frohme, M., Müller, T., Schill, R.O., Dandekar, T., 2009. Tardigrade workbench: comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades. *BMC Genomics* 10, 469. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-469>

- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N., 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4533–4537. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4533>
- França, M.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>
- Fukuda, Y., Inoue, T., 2018. Crystal structure of secretory abundant heat soluble protein 4 from one of the toughest “water bears” micro-animals *Ramazzottius varieornatus*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 27, 993–999. <https://doi.org/10.1002/pro.3393>
- Fukuda, Y., Miura, Y., Mizohata, E., Inoue, T., 2017. Structural insights into a secretory abundant heat-soluble protein from an anhydrobiotic tardigrade, *Ramazzottius varieornatus*. *FEBS Lett.* 591, 2458–2469. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12752>
- Galau, G.A., Dure, L., 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by reciprocal heterologous complementary deoxyribonucleic acid–messenger ribonucleic acid hybridization. *Biochemistry* 20, 4169–4178. <https://doi.org/10.1021/bi00517a034>
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garciarrubio, A., Covarrubias, A.A., 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* 275, 5668–5674. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., Neale, M.J., 2011. Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by MRE11 and Exo1. *Nature* 479, 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature10515>
- Garvie, C.W., Pufall, M.A., Graves, B.J., Wolberger, C., 2002. Structural analysis of the autoinhibition of ets-1 and its role in protein partnerships. *J. Biol. Chem.* 277, 45529–45536. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206327200>
- Gąsiorek, P., Morek, W., Stec, D., Blagden, B., Michalczyk, Ł., 2019. Revisiting Calohypsibiidae and Microhypsibiidae: *Fractonotus Pilato*, 1998 and its phylogenetic position within Isohypsibiidae (Eutardigrada: Parachela). *Zoosystema* 41, 71–89. <https://doi.org/10.5252/zoosystema2019v41a6>
- Gąsiorek, P., Stec, D., Morek, W., Michalczyk, Ł., 2018. An integrative redescription of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840), the nominal taxon for Hypsibiodea (Tardigrada: Eutardigrada). *Zootaxa* 4415, 45–75. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4415.1.2>
- Giovannini, I., Boothby, T.C., Cesari, M., Goldstein, B., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2022a. Production of reactive oxygen species and involvement of bioprotectants during anhydrobiosis in the tardigrade *Paramacrobiotus spatialis*. *Sci. Rep.* 12, 1938. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05734-6>
- Giovannini, I., Corsetto, P.A., Altiero, T., Montorfano, G., Guidetti, R., Rizzo, A.M., Rebecchi, L., 2022b. Antioxidant response during the kinetics of anhydrobiosis in two eutardigrade species. *Life* 12, 817. <https://doi.org/10.3390/life12060817>
- Gladyshev, E., Meselson, M., 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 5139–5144. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800966105>
- Gonzalez-Hunt, C.P., Wadhwa, M., Sanders, L.H., 2018. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Curr. Opin. Toxicol., Oxidative Toxicology: Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Health and Disease: Mechanisms, Target Organ Toxicities, and Biomarkers* 7, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.001>
- Goyal, K., Walton, L.J., Tunnacliffe, A., 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 388, 151–157. <https://doi.org/10.1042/BJ20041931>
- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., Lopez, B.S., 2012. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am. J. Cancer Res.* 2, 249–268.
- Greven, H., Greven, W., 1987. Observations on the permeability of the tardigrade cuticle using lead as an ionic tracer. pp. 35–43.
- Gross, V., Bährle, R., Mayer, G., 2018. Detection of cell proliferation in adults of the water bear *Hypsibius dujardini* (Tardigrada) via incorporation of a thymidine analog. *Tissue Cell* 51, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.03.005>
- Grothman, G.T., Johansson, C., Chilton, G., Kagoshima, H., Tsujimoto, M., Suzuki, A.C., 2017. Gilbert Rahm and the status of Mesotardigrada Rahm, 1937. *Zoolog. Sci.* 34, 5–10. <https://doi.org/10.2108/zs160109>

- Guidetti, R., Altiero, T., Marchioro, T., Sarzi Amadè, L., Avdonina, A.M., Bertolani, R., Rebecchi, L., 2012. Form and function of the feeding apparatus in Eutardigrada (Tardigrada). *Zoomorphology* 131, 127–148. <https://doi.org/10.1007/s00435-012-0149-0>
- Guidetti, R., Altiero, T., Rebecchi, L., 2011. On dormancy strategies in tardigrades. *J. Insect Physiol., Dormancy and Developmental Arrest in Invertebrates* 57, 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.003>
- Guidetti, R., Bertolani, R., 2018. Paleontology and molecular dating, in: Schill, R.O. (Ed.), *Water Bears: The Biology of Tardigrades*, Zoological Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 131–143. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_5
- Guidetti, R., Boschini, D., Altiero, T., Bertolani, R., Rebecchi, L., 2008. Diapause in tardigrades: a study of factors involved in encystment. *J. Exp. Biol.* 211, 2296–2302. <https://doi.org/10.1242/jeb.015131>
- Guidetti, R., Cesari, M., Bertolani, R., Altiero, T., Rebecchi, L., 2019. High diversity in species, reproductive modes and distribution within the *Paramacrobiotus richtersi* complex (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Zool. Lett.* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/s40851-018-0113-z>
- Guil, N., Giribet, G., 2012. A comprehensive molecular phylogeny of tardigrades—adding genes and taxa to a poorly resolved phylum-level phylogeny. *Cladistics* 28, 21–49. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2011.00364.x>
- Guil, N., Jørgensen, A., Kristensen, R., 2019. An upgraded comprehensive multilocus phylogeny of the Tardigrada tree of life. *Zool. Scr.* 48, 120–137. <https://doi.org/10.1111/zsc.12321>
- Guo, S., Chen, C., Ji, F., Mao, L., Xie, Y., 2017. PP2A catalytic subunit silence by microRNA-429 activates AMPK and protects osteoblastic cells from dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487, 660–665. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.111>
- Gupta, R., Somyajit, K., Narita, T., Maskey, E., Stanlie, A., Kremer, M., Typas, D., Lammers, M., Mailand, N., Nussenzweig, A., Lukas, J., Choudhary, C., 2018. DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. *Cell* 173, 972–988.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.050>
- Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T., Okuda, T., 2011. Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki*. *Cell Stress Chaperones* 16, 81–90. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0223-9>
- Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., Sakashita, T., Hamada, N., Kikawada, T., Kobayashi, Y., Okuda, T., 2010. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. *PLoS One* 5, e14008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014008>
- Hagiwara, Y., Oike, T., Niimi, A., Yamauchi, M., Sato, H., Limsirichaikul, S., Held, K.D., Nakano, T., Shibata, A., 2019. Clustered DNA double-strand break formation and the repair pathway following heavy-ion irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 60, 69–79. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry096>
- Halberg, K., Ramløv, H., Persson, D., Westh, P., Møbjerg, N., 2008. Characterization of cyclomorphic stages in the marine tardigrade *Halobiotus crispae*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.05.122>
- Halberg, K.A., Jørgensen, A., Møbjerg, N., 2013a. Desiccation tolerance in the tardigrade *Richtersi* *coronifer* relies on muscle mediated structural reorganization. *PLOS ONE* 8, e85091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085091>
- Halberg, K.A., Larsen, K.W., Jørgensen, A., Ramløv, H., Møbjerg, N., 2013b. Inorganic ion composition in Tardigrada: cryptobionts contain a large fraction of unidentified organic solutes. *J. Exp. Biol.* 216, 1235–1243. <https://doi.org/10.1242/jeb.075531>
- Halberg, K.A., Møbjerg, N., 2012. First evidence of epithelial transport in tardigrades: a comparative investigation of organic anion transport. *J. Exp. Biol.* 215, 497–507. <https://doi.org/10.1242/jeb.065987>
- Halberg, K.A., Persson, D., Ramløv, H., Westh, P., Kristensen, R.M., Møbjerg, N., 2009. Cyclomorphosis in Tardigrada: adaptation to environmental constraints. *J. Exp. Biol.* 212, 2803–2811. <https://doi.org/10.1242/jeb.029413>
- Hamperl, S., Cimprich, K.A., 2014. The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability. *DNA Repair* 19, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.023>

- Hara, Y., Shibahara, R., Kondo, K., Abe, W., Kunieda, T., 2021. Parallel evolution of trehalose production machinery in anhydrobiotic animals via recurrent gene loss and horizontal transfer. *Open Biol.* 11, 200413. <https://doi.org/10.1098/rsob.200413>
- Hardie, D.G., Lin, S.-C., 2017. AMP-activated protein kinase - not just an energy sensor. *F1000Research* 6, 1724. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11960.1>
- Hashimoto, T., Horikawa, D.D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., Shin-I, T., Minakuchi, Y., Ohishi, K., Motoyama, A., Aizu, T., Enomoto, A., Kondo, K., Tanaka, S., Hara, Y., Koshikawa, S., Sagara, H., Miura, T., Yokobori, S., Miyagawa, K., Suzuki, Y., Kubo, T., Oyama, M., Kohara, Y., Fujiyama, A., Arakawa, K., Katayama, T., Toyoda, A., Kunieda, T., 2016a. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat. Commun.* 7, 12808. <https://doi.org/10.1038/ncomms12808>
- Hashimoto, T., Kunieda, T., 2017. DNA protection protein, a novel mechanism of radiation tolerance: lessons from tardigrades. *Life* 7, 26. <https://doi.org/10.3390/life7020026>
- Hecox-Lea, B.J., Mark Welch, D.B., 2018. Evolutionary diversity and novelty of DNA repair genes in asexual Bdelloid rotifers. *BMC Evol. Biol.* 18, 177. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1288-9>
- Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G.W., Edgecombe, G.D., Martinez, P., Baguñà, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Müller, W.E.G., Seaver, E., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G., Dunn, C.W., 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 4261–4270. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0896>
- Hengherr, S., Brümmer, F., Schill, R.O., 2008. Anhydrobiosis in tardigrades and its effects on longevity traits. *J. Zool.* 275, 216–220. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00427.x>
- Hengherr, Steffen, Heyer, A.G., Köhler, H.-R., Schill, R.O., 2008. Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades – evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS J.* 275, 281–288. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06198.x>
- Hengherr, S., Worland, M.R., Reuner, A., Brümmer, F., Schill, R.O., 2009. Freeze tolerance, supercooling points and ice formation: comparative studies on the subzero temperature survival of limno-terrestrial tardigrades. *J. Exp. Biol.* 212, 802–807. <https://doi.org/10.1242/jeb.025973>
- Hespeels, B., Knapen, M., Hanot-Mambres, D., Heuskin, A.-C., Pineux, F., Lucas, S., Koszul, R., van Doninck, K., 2014. Gateway to genetic exchange? DNA double-strand breaks in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* submitted to desiccation. *J. Evol. Biol.* 27, 1334–1345. <https://doi.org/10.1111/jeb.12326>
- Hespeels, B., Penninckx, S., Cornet, V., Bruneau, L., Bopp, C., Baumlé, V., Redivo, B., Heuskin, A.-C., Moeller, R., Fujimori, A., Lucas, S., Van Doninck, K., 2020. Iron ladies – how desiccated asexual rotifer *Adineta vaga* deal with x-rays and heavy ions? *Front. Microbiol.* 11, 1792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01792>
- Hibshman, J.D., Goldstein, B., 2021. LEA motifs promote desiccation tolerance in vivo. *BMC Biol.* 19, 263. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01176-0>
- Horikawa, D., Higashi, S., 2004. Desiccation tolerance of the tardigrade *Milnesium tardigradum* collected in Sapporo, Japan, and Bogor, Indonesia. *Zoolog. Sci.* 21, 813–6. <https://doi.org/10.2108/zsj.21.813>
- Horikawa, D.D., Cumbers, J., Sakakibara, I., Rogoff, D., Leuko, S., Harnoto, R., Arakawa, K., Katayama, T., Kunieda, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Rothschild, L.J., 2013. Analysis of DNA Repair and Protection in the Tardigrade *Ramazzottius varieornatus* and *Hypsibius dujardini* after Exposure to UVC Radiation. *PLOS ONE* 8, e64793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064793>
- Horikawa, D.D., Kunieda, T., Abe, W., Watanabe, M., Nakahara, Y., Yukuhiro, F., Sakashita, T., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., Katagiri, C., Kobayashi, Y., Higashi, S., Okuda, T., 2008. Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: a new model animal for astrobiology. *Astrobiology* 8, 549–556. <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0139>
- Huertas, P., Jackson, S.P., 2009. Human CTIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 284, 9558–9565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>
- Hunault, G., Jaspard, E., 2010. LEAPdb: a database for the late embryogenesis abundant proteins. *BMC Genomics* 11, 221. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-221>
- Hundertmark, M., Hinch, D.K., 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118>

- Hygum, T.L., Clausen, L.K.B., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Møbjerg, N., 2016. Tun formation is not a prerequisite for desiccation tolerance in the marine tidal tardigrade *Echiniscoides sigismundi*. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 907–911. <https://doi.org/10.1111/zoj.12444>
- Hygum, T.L., Fobian, D., Kamilari, M., Jørgensen, A., Schjøtt, M., Grosell, M., Møbjerg, N., 2017. Comparative investigation of copper tolerance and identification of putative tolerance related genes in tardigrades. *Front. Physiol.* 8.
- Hyra, M., Rost-Roszkowska, M.M., Student, S., Włodarczyk, A., Deperas, M., Janelt, K., Poprawa, I., 2016. Body cavity cells of Parachela during their active life. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 878–887. <https://doi.org/10.1111/zoj.12463>
- Ingemar Jönsson, K., Persson, O., 2010. Trehalose in three species of desiccation tolerant tardigrades. *Open Zool. J.* 3.
- Janis, B., Belott, C., Menze, M.A., 2018. Role of intrinsic disorder in animal desiccation tolerance. *Proteomicq* 18, 1800067. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800067>
- Jezierska, M., Miernik, A., Sojka, J., Student, S., Śliwińska, M.A., Gross, V., Poprawa, I., 2021. Oogenesis in the tardigrade *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk, 2018 (Eutardigrada, Hypsibiidae). *Micron* 150, 103126. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103126>
- Jiang, Z., Hu, Z., Zeng, L., Lu, W., Zhang, H., Li, T., Xiao, H., 2011. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* 50, 907–917. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.011>
- Jönsson, K.I., 2005. The evolution of life histories in holo-anhydrobiotic animals: a first approach. *Integr. Comp. Biol.* 45, 764–770. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.764>
- Jönsson, K.I., Rebecchi, L., 2002. Experimentally induced anhydrobiosis in the tardigrade *Richtersius coronifer*: phenotypic factors affecting survival. *J. Exp. Zool.* 293, 578–584. <https://doi.org/10.1002/jez.10186>
- Jönsson, K.I., Schill, R.O., 2007. Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 146, 456–460. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.10.111>
- Jönsson, K.I., Wojcik, A., 2017. Tolerance to X-rays and Heavy Ions (Fe, He) in the Tardigrade *Richtersius coronifer* and the Bdelloid Rotifer *Mniobia russeola*. *Astrobiology* 17, 163–167. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1462>
- Jørgensen, A., Faurby, S., Hansen, J.G., Møbjerg, N., Kristensen, R.M., 2010. Molecular phylogeny of Arthrotardigrada (Tardigrada). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 1006–1015. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.006>
- Jørgensen, A., Kristensen, R.M., 2004. Molecular phylogeny of Tardigrada—investigation of the monophyly of HeteroTardigrada. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 666–670. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.04.017>
- Jørgensen, A., Kristensen, R.M., Møbjerg, N., 2018. Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada, in: Schill, R.O. (Ed.), *Water Bears: The Biology of Tardigrades*, Zoological Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 95–114. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_3
- Jørgensen, A., Møbjerg, N., 2015. Notes on the cryptobiotic capability of the marine arthrotardigrades *Styraconyx haploceros* (Halechiniscidae) and *Batillipes pennaki* (Batillipedidae) from the tidal zone in Roscoff, France. *Mar. Biol. Res.* 11, 214–217. <https://doi.org/10.1080/17451000.2014.904883>
- Jørgensen, A., Møbjerg, N., Kristensen, R.M., 2011. Phylogeny and evolution of the Echiniscidae (Echiniscoidea, Tardigrada) – an investigation of the congruence between molecules and morphology. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 49, 6–16. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00592.x>
- Jørgensen, A., Møbjerg, N., Kristensen, R.M., 2007. A molecular study of the tardigrade *Echiniscus testudo* (Echiniscidae) reveals low DNA sequence diversity over a large geographical area. *J. Limnol.* 66, 77–83. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2007.s1.77>
- Joseph, B.K., Liu, H.-Y., Francisco, J., Pandya, D., Donigan, M., Gallo-Ebert, C., Giordano, C., Bata, A., Nickels, J.T., 2015. Inhibition of AMP kinase by the protein phosphatase 2a heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *J. Biol. Chem.* 290, 10588–10598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626259>
- Júnior, E., Santos, É., Rocha, C., Santos, P., Fontoura, P., 2020. The Deep-Sea Genus *Coronarctus* (Tardigrada, Arthrotardigrada) in Brazil, South-Western Atlantic Ocean, with the Description of Three New Species. *Diversity* 12, 63. <https://doi.org/10.3390/d12020063>

- Kaczmarek, Ł., Mioduchowska, M., Kačarević, U., Kubska, K., Parnikoza, I., Gołdyn, B., Roszkowska, M., 2020. New records of antarctic tardigrada with comments on interpopulation variability of the *Paramacrobotus fairbanksi*. *Diversity* 12, 108. <https://doi.org/10.3390/d12030108>
- Kadioglu, O., Chan, A., Cong Ling Qiu, A., Wong, V.K.W., Colligs, V., Wecklein, S., Freund-Henni Rached, H., Efferth, T., Hsiao, W.-L.W., 2017. Artemisinin derivatives target topoisomerase 1 and cause DNA damage in silico and in vitro. *Front. Pharmacol.* 8.
- Kamilari, M., Jørgensen, A., Schiøtt, M., Møbjerg, N., 2019. Comparative transcriptomics suggest unique molecular adaptations within tardigrade lineages. *BMC Genomics* 20, 607. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5912-x>
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., Lahav, G., 2012. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* 47, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>
- Keilin, D., 1959. The Leeuwenhoek Lecture - The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B - Biol. Sci.* 150, 149–191. <https://doi.org/10.1098/rspb.1959.0013>
- Khurana, S., Kruhlak, M.J., Kim, J., Tran, A.D., Liu, J., Nyswaner, K., Shi, L., Jailwala, P., Sung, M.-H., Hakim, O., Oberdoerffer, P., 2014. A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to BRCA1-dependent genome maintenance. *Cell Rep.* 8, 1049–1062. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.024>
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A., Okuda, T., 2006. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.003>
- Kikuchi, K., Abdel-Aziz, H.I., Taniguchi, Y., Yamazoe, M., Takeda, S., Hirota, K., 2009. Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences. *J. Biol. Chem.* 284, 26360–26367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.029348>
- Kim, N., Jinks-Robertson, S., 2012. Transcription as a source of genome instability. *Nat. Rev. Genet.* 13, 204–214. <https://doi.org/10.1038/nrg3152>
- Kinchin, I.M., 1995. The biology of tardigrades. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 75, 262–262. <https://doi.org/10.1017/S002531540001540X>
- Kirke, J., Jin, X.-L., Zhang, X.-H., 2020. Expression of a tardigrade dsup gene enhances genome protection in plants. *Mol. Biotechnol.* 62, 563–571. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00273-9>
- Kondo, K., Kubo, T., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144803>
- Kondo, K., Mori, M., Tomita, M., Arakawa, K., 2020. Pre-treatment with D942, a furancarboxylic acid derivative, increases desiccation tolerance in an anhydrobiotic tardigrade *Hypsibius exemplaris*. *FEBS Open Bio* 10, 1774–1781. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12926>
- Kondo, K., Mori, M., Tomita, M., Arakawa, K., 2019. AMPK activity is required for the induction of anhydrobiosis in a tardigrade *Hypsibius exemplaris*, and its potential up-regulator is PP2A. *Genes Cells* 24, 768–780. <https://doi.org/10.1111/gtc.12726>
- Koster, K.L., Leopold, A.C., 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88, 829–832.
- Kowalczykowski, S.C., 2015. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016410. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016410>
- Kranner, I., Birtić, S., 2005. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr. Comp. Biol.* 45, 734–740. <https://doi.org/10.1093/icb/45.5.734>
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., Zhao, X., 2012. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>
- Kristensen, R., Renaud-Mornant, J., 1983. Existence d'arthrotardigrades semi-benthiques de genres nouveaux de la sous-famille des styraconyxinae subfam. nov. URL [https://snm.ku.dk/english/staffsnm/staff/?pure=en%2Fpublications%2Fexistence-darthrotardigrades-semibenthiques-de-genres-nouveaux-de-la-sousfamille-des-styraconyxinae-subfam-nov\(4ff1be10-6697-11dc-bee9-02004c4f4f50\)%2Fexport.html](https://snm.ku.dk/english/staffsnm/staff/?pure=en%2Fpublications%2Fexistence-darthrotardigrades-semibenthiques-de-genres-nouveaux-de-la-sousfamille-des-styraconyxinae-subfam-nov(4ff1be10-6697-11dc-bee9-02004c4f4f50)%2Fexport.html) (accessed 9.28.22).

- Kristensen, R.M., Higgins, R.P., 1984. Revision of *Styracony* (Tardigrada: Halechiniscidae) with descriptions of two new species from Disko Bay, West Greenland.
- Krokan, H.E., Sætrum, P., Aas, P.A., Pettersen, H.S., Kavli, B., Slupphaug, G., 2014. Error-free versus mutagenic processing of genomic uracil—Relevance to cancer. *DNA Repair, Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance* 19, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.028>
- Kumagai, H., Kondo, K., Kunieda, T., 2022. Application of CRISPR/Cas9 system and the preferred no-indel end-joining repair in tardigrades. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 623, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.060>
- Kuzmic, M., Richaud, M., Cuq, P., Frelon, S., Galas, S., 2018. Carbonylation accumulation of the *Hypsibius exemplaris* anhydrobiote reveals age-associated marks. *PLOS ONE* 13, e0208617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208617>
- Lapinski, J., Tunnacliffe, A., 2003. Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS Lett.* 553, 387–390. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01062-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01062-7)
- LaRocque, J.R., Jasin, M., 2010. Mechanisms of recombination between diverged sequences in wild-type and BLM-deficient mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1887–1897. <https://doi.org/10.1128/MCB.01553-09>
- Levi, A.J., Arias, I.M., 1969. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. Clin. Invest.* 48, 2156–2167.
- Li, G.-M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85–98. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.115>
- Li, S., Chakraborty, N., Borcar, A., Menze, M.A., Toner, M., Hand, S.C., 2012. Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20859–20864. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214893109>
- Li, X., Li, S., Dai, C., Li, J., Huang, D., Wang, J., 2018. PP2A inhibition by LB-100 protects retinal pigment epithelium cells from UV radiation via activation of AMPK signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.077>
- Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Linke, R., Limmer, M., Juranek, S.A., Heine, A., Paeschke, K., 2021. The relevance of G-quadruplexes for DNA repair. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12599. <https://doi.org/10.3390/ijms222212599>
- Liu, G., Xu, H., Zhang, L., Zheng, Y., 2011. Fe binding properties of two soybean (*Glycine max* L.) LEA4 proteins associated with antioxidant activity. *Plant Cell Physiol.* 52, 994–1002. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr052>
- Liu, Y., Zhang, C., Wang, Z., Lin, M., Wang, J., Wu, M., 2021. Pleiotropic roles of late embryogenesis abundant proteins of *Deinococcus radiodurans* against oxidation and desiccation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 3407–3415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.051>
- Lunn, J.E., Delorge, I., Figueroa, C.M., Van Dijck, P., Stitt, M., 2014. Trehalose metabolism in plants. *Plant J.* 79, 544–567. <https://doi.org/10.1111/tpj.12509>
- M. Anderson, S.J.M., E.G. Wright, M.A. Kadhim, D.T. Goodhead, C.S. Griffin, R., 2000. Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 31–42. <https://doi.org/10.1080/095530000138989>
- Maas, A., Waloszek, D., 2001. Cambrian derivatives of the early arthropod stem lineage, pentastomids, tardigrades and lobopodians an ‘orsten’ perspective. *Zool. Anz. - J. Comp. Zool.* 240, 451–459. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00053>
- Mahaney, B.L., Hammel, M., Meek, K., Tainer, J.A., Lees-Miller, S.P., 2013. XRCC4 and XLF form long helical protein filaments suitable for DNA end protection and alignment to facilitate DNA double strand break repair. *Biochem. Cell Biol.* 91, 31–41. <https://doi.org/10.1139/bcb-2012-0058>
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., 2008. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* 7, 1765–1771. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.06.018>
- Mark Welch, D.B., Mark Welch, J.L., Meselson, M., 2008. Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 5145–5149. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800972105>

- Mark Welch, D.B., Meselson, M., 2000. Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* 288, 1211–1215. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1211>
- Marlétaz, F., Peijnenburg, K.T.C.A., Goto, T., Satoh, N., Rokhsar, D.S., 2019. A new spiralian phylogeny places the enigmatic arrow worms among Gnathiferans. *Curr. Biol.* 29, 312–318.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.042>
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., 2014. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>
- Marunde, M.R., Samarajeewa, D.A., Anderson, J., Li, S., Hand, S.C., Menze, M.A., 2013. Improved tolerance to salt and water stress in *Drosophila melanogaster* cells conferred by late embryogenesis abundant protein. *J. Insect Physiol.* 59, 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.01.004>
- Mateos-Gomez, P.A., Gong, F., Nair, N., Miller, K.M., Lazerini-Denchi, E., Sfeir, A., 2015. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* 518, 254–257. <https://doi.org/10.1038/nature14157>
- Mattimore, V., Battista, J.R., 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* 178, 633–637. <https://doi.org/10.1128/jb.178.3.633-637.1996>
- Mavragani, I.V., Nikitaki, Z., Kalospyros, S.A., Georgakilas, A.G., 2019. Ionizing radiation and complex DNA damage: from prediction to detection challenges and biological significance. *Cancers* 11, 1789. <https://doi.org/10.3390/cancers11111789>
- May, R.M., Maria, M., Guimard, J., 1964. Action différentielle des rayons X et ultraviolet sur le tardigrade *Macrobiotus areolatus* à l'état actif et desséché.
- Mínguez-Toral, M., Cuevas-Zuñiga, B., Garrido-Arandia, M., Pacios, L.F., 2020. A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique Dsup protein. *Sci. Rep.* 10, 13424. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70431-1>
- Møbjerg, N., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Persson, D., Bjørn, M., Ramløv, H., Kristensen, R.M., 2011. Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta Physiol.* 202, 409–420. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02252.x>
- Møbjerg, N., Jørgensen, A., Eibye-Jacobsen, J., Halberg, K., Persson, D., Kristensen, R., 2007. New records on cyclomorphosis in the marine eutardigrade *Halobiotus crispae* (Eutardigrada: Hypsibiidae). *J. Limnol.* 66, 132–140. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2007.s1.132>
- Møbjerg, N., Jørgensen, A., Kristensen, R.M., Neves, R.C., 2018. Morphology and Functional Anatomy, in: Schill, R.O. (Ed.), *Water Bears: The Biology of Tardigrades*, Zoological Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 57–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_2
- Møbjerg, N., Neves, R.C., 2021. New insights into survival strategies of tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 254, 110890. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110890>
- Mogle, M.J., Kimball, S.A., Miller, W.R., McKown, R.D., 2018. Evidence of avian-mediated long distance dispersal in American tardigrades. *PeerJ* 6, e5035. <https://doi.org/10.7717/peerj.5035>
- Morek, W., Michalczyk, Ł., 2020. First extensive multilocus phylogeny of the genus *Milnesium* (Tardigrada) reveals no congruence between genetic markers and morphological traits. *Zool. J. Linn. Soc.* 188, 681–693. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz040>
- Mullenders, L.H.F., 2018. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* 17, 1842–1852. <https://doi.org/10.1039/C8PP00182K>
- Muller, H.J., 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* 106, 2–9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(64\)90047-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(64)90047-8)
- Murai, Y., Yagi-Utsumi, M., Fujiwara, M., Tanaka, S., Tomita, M., Kato, K., Arakawa, K., 2021. Multiomics study of a heterotardigrade, *Echiniscus testudo*, suggests the possibility of convergent evolution of abundant heat-soluble proteins in Tardigrada. *BMC Genomics* 22, 813. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08131-x>
- Murray, V., Chen, J.K., Chung, L.H., 2018. The interaction of the metallo-glycopeptide anti-tumour drug bleomycin with DNA. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1372. <https://doi.org/10.3390/ijms19051372>
- Nakahara, Y., Watanabe, M., Fujita, A., Kanamori, Y., Tanaka, D., Iwata, K., Furuki, T., Sakurai, M., Kikawada, T., Okuda, T., 2008. Effects of dehydration rate on physiological responses and survival after

- rehydration in larvae of the anhydrobiotic chironomid. *J. Insect Physiol.* 54, 1220–1225. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.05.007>
- Nanduri, R., Furusawa, T., Bustin, M., 2020. Biological Functions of HMGN Chromosomal Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 449. <https://doi.org/10.3390/ijms21020449>
- Narasimha, A., Basu, B., 2021. New insights into the activation of radiation desiccation response regulon in *Deinococcus radiodurans*. *J. Biosci.* 46, 10. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00123-5>
- Nelson, D., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2015. Phylum Tardigrada, in: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates: Ecology and General Biology: Fourth Edition. pp. 347–380. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00017-6>
- Nelson, D.R., Bartels, P.J., Guil, N., 2018. Tardigrade ecology, in: Schill, R.O. (Ed.), Water bears: The biology of tardigrades, Zoological Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 163–210. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_7
- Neumann, S., Reuner, A., Brümmer, F., Schill, R.O., 2009. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 425–429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.611>
- Ng, W.O., Zentella, R., Wang, Y., Taylor, J.S., Pakrasi, H.B., 2000. PhrA, the major photoreactivating factor in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 codes for a cyclobutane-pyrimidine-dimer-specific DNA photolyase. *Arch. Microbiol.* 173, 412–417. <https://doi.org/10.1007/s002030000164>
- Nguyen, K., Kc, S., Gonzalez, T., Tapia, H., Boothby, T.C., 2022. Trehalose and tardigrade CAHS proteins work synergistically to promote desiccation tolerance. *Commun. Biol.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04015-2>
- Nichols, P.B., Nelson, D.R., Garey, J.R., 2006. A family level analysis of tardigrade phylogeny. *Hydrobiologia* 558, 53–60. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1414-8>
- Nowell, R.W., Wilson, C.G., Almeida, P., Schiffer, P.H., Fontaneto, D., Becks, L., Rodriguez, F., Arkhipova, I.R., Barraclough, T.G., 2021. Evolutionary dynamics of transposable elements in bdelloid rotifers. *eLife* 10, e63194. <https://doi.org/10.7554/eLife.63194>
- Okuda, T., 2006. Trehalose: a molecule responsible for desiccation tolerance in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Netsu Sokutei* 33, 20–26. <https://doi.org/10.11311/jscta1974.33.20>
- Oliver, S.S., Denu, J.M., 2011a. Disrupting the reader of histone language. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5801–5803. <https://doi.org/10.1002/anie.201101414>
- Oliver, S.S., Denu, J.M., 2011b. Dynamic interplay between histone H3 modifications and protein interpreters: emerging evidence for a “histone language.” *ChemBioChem* 12, 299–307. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000474>
- Paull, T.T., Gellert, M., 1998. The 3' to 5' exonuclease activity of MRE11 facilitates repair of dna double-strand breaks. *Mol. Cell* 1, 969–979. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80097-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80097-0)
- Persson, D.K., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Møbjerg, N., Kristensen, R.M., 2014. Brain anatomy of the marine tardigrade *Actinarctus doryphorus* (Arthrotardigrada). *J. Morphol.* 275, 173–190. <https://doi.org/10.1002/jmor.20207>
- Persson, D.K., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Møbjerg, N., Kristensen, R.M., 2012. Neuroanatomy of *Halobiotus crispae* (Eutardigrada: Hypsibiidae): Tardigrade brain structure supports the clade panarthropoda. *J. Morphol.* 273, 1227–1245. <https://doi.org/10.1002/jmor.20054>
- Pilato, G., Binda, M.G., 2001. Biogeography and limno-terrestrial tardigrades: are they truly incompatible binomials? *Zool. Anz. - J. Comp. Zool.* 240, 511–516. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00061>
- Plitta-Michalak, B.P., Ramos, A.A., Pupel, P., Michalak, M., 2022. Oxidative damage and DNA repair in desiccated recalcitrant embryonic axes of *Acer pseudoplatanus* L. *BMC Plant Biol.* 22, 40. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03419-2>
- Pollock, L.W., 1995. New marine tardigrades from hawaiian beach sand and phylogeny of the family halechiniscidae. *Invertebr. Biol.* 114, 220–235. <https://doi.org/10.2307/3226877>
- Pomerantz, R.T., O'Donnell, M., 2010. What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* 9, 2537–2543. <https://doi.org/10.4161/cc.9.13.12122>
- Ponnudurai, R., Kleiner, M., Sayavedra, L., Petersen, J.M., Moche, M., Otto, A., Becher, D., Takeuchi, T., Satoh, N., Dubilier, N., Schweder, T., Markert, S., 2017. Metabolic and physiological interdependencies in the *Bathymodiolus azoricus* symbiosis. *ISME J.* 11, 463–477. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.124>

- Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., Carpenter, J.F., 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65, 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81120-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81120-2)
- Puig, J., Knödlseeder, N., Quera, J., Algara, M., Güell, M., 2021. Dna damage protection for enhanced bacterial survival under simulated low earth orbit environmental conditions in *escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 12, 789668. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.789668>
- Rabeling, C., Kronauer, D.J.C., 2013. Thelytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 273–292. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153710>
- Rachael, 2021. Facts about Tardigrades (Water Bears) [WWW Document]. *Rs Sci.* URL <https://rsscience.com/tardigrades-water-bears/> (accessed 1.13.23).
- Ramazzotti, G., Maucci, W., 1983. Il phylum Tardigrada : III edizione riveduta e aggiornata. *Mem Ist Ital Idrobiol* 41, 1–1012.
- Ramlø, H., Westh, P., 2001. Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus (richtersius) coronifer*: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. *Zool. Anz. - J. Comp. Zool.* 240, 517–523. <https://doi.org/10.1078/0044-5231-00062>
- Rastogi, R.P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M.B., Sinha, R.P., 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids* 2010, 592980. <https://doi.org/10.4061/2010/592980>
- Rebecchi, L., Altiero, T., Guidetti, R., 2007. Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebr. Surviv. J.* 4.
- Rebecchi, L., Guidetti, R., Borsari, S., Altiero, T., Bertolani, R., 2006. Dynamics of long-term anhydrobiotic survival of lichen-dwelling tardigrades. *Hydrobiologia* 558, 23–30. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1415-7>
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Kambic, R.E., Nelson, D.R., 2004. Robust support for tardigrade clades and their ages from three protein-coding nuclear genes. *Invertebr. Biol.* 123, 93–100. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2004.tb00145.x>
- Ricci, C., 2017. Bdelloid rotifers: ‘sleeping beauties’ and ‘evolutionary scandals’, but not only. *Hydrobiologia* 796, 277–285. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2919-z>
- Ricci, C., Caprioli, M., Boschetti, C., Santo, N., 2005. *Macrotrachela quadricornifera* featured in a space experiment. *Hydrobiologia* 534, 239–244. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-1509-7>
- Ricci, C., Covino, C., 2005. Anhydrobiosis of *Adineta ricciae*: costs and benefits, in: *Hydrobiologia*. pp. 307–314. https://doi.org/10.1007/1-4020-4408-9_31
- Rizzo, A.M., Negroni, M., Altiero, T., Montorfano, G., Corsetto, P., Berselli, P., Berra, B., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2010. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 156, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.009>
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I., 2009. DNA repair in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 981–993. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8736-z>
- Rota-Stabelli, O., Daley, A.C., Pisani, D., 2013. Molecular timetrees reveal a cambrian colonization of land and a new scenario for ecdysozoan evolution. *Curr. Biol.* 23, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.026>
- Rota-Stabelli, O., Kayal, E., Gleeson, D., Daub, J., Boore, J.L., Telford, M.J., Pisani, D., Blaxter, M., Lavrov, D.V., 2010. Ecdysozoan mitogenomics: evidence for a common origin of the legged invertebrates, the panarthropoda. *Genome Biol. Evol.* 2, 425–440. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq030>
- Rumora, A.E., Kolodziejczak, K.M., Wagner, A.M., Núñez, M.E., 2008. Thymine dimer-induced structural changes to the DNA duplex examined with reactive probes. *Biochemistry* 47, 13026–13035. <https://doi.org/10.1021/bi801417u>
- Russouw, P.S., Farrant, J., Brandt, W., Maeder, D., Lindsey, G.G., 1995. Isolation and characterization of a heat-soluble protein from pea (*Pisum sativum*) embryos. *Seed Sci. Res.* 5, 137–144. <https://doi.org/10.1017/S0960258500002750>
- Rybaczek, D., Kowalewicz-Kulbat, M., Rybaczek, D., Kowalewicz-Kulbat, M., 2013. Relation of the types of dna damage to replication stress and the induction of premature chromosome condensation. *New Research Directions in DNA Repair.* IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/54020>

- Salvador, J.M., Brown-Clay, J.D., Fornace, A.J., 2013. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis, in: Liebermann, D.A., Hoffman, B. (Eds.), *Gadd45 Stress Sensor Genes*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, NY, pp. 1–19.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8289-5_1
- Sands, C.J., McInnes, S.J., Marley, N.J., Goodall-Copestake, W.P., Convey, P., Linse, K., 2008. Phylum Tardigrada: an “individual” approach. *Cladistics* 24, 861–871. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00219.x>
- Sausville, E.A., Peisach, J., Horwitz, S.B., 1978. Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. *Biochemistry* 17, 2740–2746. <https://doi.org/10.1021/bi00607a007>
- Schill, R.O., Hengherr, S., 2018. Environmental adaptations: Desiccation tolerance, in: Schill, R.O. (Ed.), *Water bears: The biology of tardigrades*, *Zoological Monographs*. Springer International Publishing, Cham, pp. 273–293. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_10
- Schill, R.O., Steinbrück, G.H.B., Köhler, H.-R., 2004. Stress gene (hsp70) sequences and quantitative expression in *Milnesium tardigradum* (Tardigrada) during active and cryptobiotic stages. *J. Exp. Biol.* 207, 1607–1613. <https://doi.org/10.1242/jeb.00935>
- Schulze, C., Persson, D., 2015. Tardigrada, in: Schmidt-Rhaesa, A., Harzsch, S., Purschke, G. (Eds.), *Structure and evolution of invertebrate nervous systems*. Oxford University Press, p. 0.
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199682201.003.0031>
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Smith, F.W., Goldstein, B., 2017. Segmentation in Tardigrada and diversification of segmental patterns in Panarthropoda. *Arthropod Struct. Dev., Evolution of Segmentation* 46, 328–340.
<https://doi.org/10.1016/j.asd.2016.10.005>
- Sollier, J., Cimprich, K.A., 2015. Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends Cell Biol.* 25, 514–522.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.003>
- Solomon, A., Salomon, R., Paperna, I., Glazer, I., 2000. Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology* 121 (Pt 4), 409–416.
<https://doi.org/10.1017/s0031182099006563>
- Sørensen-Hygun, T.L., Stuart, R.M., Jørgensen, A., Møbjerg, N., 2018. Modelling extreme desiccation tolerance in a marine tardigrade. *Sci. Rep.* 8, 11495. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29824-6>
- Sturzenegger, A., Burdova, K., Kanagaraj, R., Levikova, M., Pinto, C., Cejka, P., Janscak, P., 2014. DNA2 Cooperates with the WRN and BLM RecQ Helicases to Mediate Long-range DNA End Resection in Human Cells*. *J. Biol. Chem.* 289, 27314–27326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578823>
- Sutherland, B.M., Georgakilas, A.G., Bennett, P.V., Laval, J., Sutherland, J.C., 2003. Quantifying clustered DNA damage induction and repair by gel electrophoresis, electronic imaging and number average length analysis. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Oxidative DNA Damage and its Repair Base Excision Repair* 531, 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.005>
- Symington, L.S., Gautier, J., 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 45, 247–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
- Tanaka, S., Tanaka, J., Miwa, Y., Horikawa, D.D., Katayama, T., Arakawa, K., Toyoda, A., Kubo, T., Kunieda, T., 2015. Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic tardigrade improve osmotic tolerance of human cells. *PLoS ONE* 10, e0118272.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118272>
- Tapia, H., Koshland, D.E., 2014. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Curr. Biol. CB* 24, 2758–2766. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>
- Telford, M.J., Bourlat, S.J., Economou, A., Papillon, D., Rota-Stabelli, O., 2008a. The evolution of the Ecdysozoa. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 1529–1537.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2243>
- Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., Wu, X., 2013. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7720–7725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213431110>

- Tsujimoto, M., Imura, S., Kanda, H., 2016. Recovery and reproduction of an Antarctic tardigrade retrieved from a moss sample frozen for over 30 years. *Cryobiology* 72, 78–81. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.12.003>
- Tsujimoto, M., McInnes, S.J., Convey, P., Imura, S., 2014. Preliminary description of tardigrade species diversity and distribution pattern around coastal Syowa Station and inland Sør Rondane Mountains, Dronning Maud Land, East Antarctica. *Polar Biol.* 37, 1361–1367. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1516-8>
- Van Doninck, K., Mandigo, M.L., Hur, J.H., Wang, P., Guglielmini, J., Milinkovitch, M.C., Lane, W.S., Meselson, M., 2009. Phylogenomics of unusual histone H2A variants in bdelloid rotifers. *PLOS Genet.* 5, e1000401. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000401>
- Van Dyke, T., 2007. P53 and tumor suppression. *N. Engl. J. Med.* 356, 79–81. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr066301>
- Van Veldhoven, P., Baes, M., 2013. Peroxisome deficient invertebrate and vertebrate animal models. *Front. Physiol.* 4.
- Vicente, F., Bertolani, R., 2013. Considerations on the taxonomy of the Phylum Tardigrada. *Zootaxa* 3626, 245–248. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3626.2.2>
- Vincent, S.H., Muller-Eberhard, U., 1985. A protein of the Z class of liver cytosolic proteins in the rat that preferentially binds heme. *J. Biol. Chem.* 260, 14521–14528. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38600-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38600-3)
- Vriezen, J.A.C., de Bruijn, F.J., Nüsslein, K., 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3451–3459. <https://doi.org/10.1128/AEM.02991-06>
- Walsh, B., 2003. Population-genetic models of the fates of duplicate genes. *Genetica* 118, 279–294. <https://doi.org/10.1023/A:1024194802441>
- Walz, B., 1978. Electron microscopic investigation of cephalic sense organs of the tardigrade *Macrobotus hufelandi* C.A.S. Schultze. *Zoomorphologie* 89, 1–19. <https://doi.org/10.1007/BF00993778>
- Wang, T., Yu, Q., Chen, J., Deng, B., Qian, L., Le, Y., 2010. PP2A mediated AMPK inhibition Promotes HSP70 expression in heat shock response. *PLOS ONE* 5, e13096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013096>
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., Okuda, T., 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.* 205, 2799–2802. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.18.2799>
- Watanabe, M., Nakahara, Y., Sakashita, T., Kikawada, T., Fujita, A., Hamada, N., Horikawa, D.D., Wada, S., Kobayashi, Y., Okuda, T., 2007. Physiological changes leading to anhydrobiosis improve radiation tolerance in *Polypedilum vanderplanki* larvae. *J. Insect Physiol.* 53, 573–579. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.02.008>
- Watanabe, M., Sakashita, T., Fujita, A., Kikawada, T., Horikawa, D.D., Nakahara, Y., Wada, S., Funayama, T., Hamada, N., Kobayashi, Y., Okuda, T., 2006a. Biological effects of anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki* on radiation tolerance. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 587–592. <https://doi.org/10.1080/09553000600876652>
- Watanabe, M., Sakashita, T., Fujita, A., Kikawada, T., Nakahara, Y., Hamada, N., Horikawa, D.D., Wada, S., Funayama, T., Kobayashi, Y., Okuda, T., 2006b. Estimation of radiation tolerance to high LET heavy ions in an anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 835–842. <https://doi.org/10.1080/09553000600979100>
- Westh, P., Ramløv, H., 1991. Trehalose accumulation in the tardigrade *Adorybiotus coronifer* during anhydrobiosis. *J. Exp. Zool.* 258, 303–311. <https://doi.org/10.1002/jez.1402580305>
- Wickramasinghe, V.O., Laskey, R.A., 2015. Control of mammalian gene expression by selective mRNA export. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 431–442. <https://doi.org/10.1038/nrm4010>
- Wojciechowska, D., Karachitos, A., Roszkowska, M., Rzeźniczak, W., Sobkowiak, R., Kaczmarek, Ł., Kosicki, J.Z., Kmita, H., 2021. Mitochondrial alternative oxidase contributes to successful tardigrade anhydrobiosis. *Front. Zool.* 18, 15. <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00400-5>
- Worland, M.R., Grubor-Lajsic, G., Montiel, P.O., 1998. Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *J. Insect Physiol.* 44, 211–219. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(97\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(97)00166-2)

- Wright, J.C., 1989. Desiccation tolerance and water-retentive mechanisms in tardigrades. *J. Exp. Biol.* 142, 267–292. <https://doi.org/10.1242/jeb.142.1.267>
- Yagi-Utsumi, M., Aoki, K., Watanabe, H., Song, C., Nishimura, S., Satoh, T., Yanaka, S., Ganser, C., Tanaka, S., Schnapka, V., Goh, E.W., Furutani, Y., Murata, K., Uchihashi, T., Arakawa, K., Kato, K., 2021a. Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade. <https://doi.org/10.1101/2021.06.22.449423>
- Yagi-Utsumi, M., Aoki, K., Watanabe, H., Song, C., Nishimura, S., Satoh, T., Yanaka, S., Ganser, C., Tanaka, S., Schnapka, V., Goh, E.W., Furutani, Y., Murata, K., Uchihashi, T., Arakawa, K., Kato, K., 2021b. Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade. *Sci. Rep.* 11, 21328. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00724-6>
- Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., Imajoh-Ohmi, S., Horikawa, D.D., Toyoda, A., Katayama, T., Arakawa, K., Fujiyama, A., Kubo, T., Kunieda, T., 2012. Two novel heat-soluble protein families abundantly expressed in an anhydrobiotic tardigrade. *PLoS ONE* 7, e44209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044209>
- Yoshida, Y., Koutsovoulos, G., Laetsch, D.R., Stevens, L., Kumar, S., Horikawa, D.D., Ishino, K., Komine, S., Kunieda, T., Tomita, M., Blaxter, M., Arakawa, K., 2017. Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. *PLoS Biol.* 15, e2002266. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002266>
- Yoshida, Y., Satoh, T., Ota, C., Tanaka, S., Horikawa, D.D., Tomita, M., Kato, K., Arakawa, K., 2022. Time-series transcriptomic screening of factors contributing to the cross-tolerance to UV radiation and anhydrobiosis in tardigrades. *BMC Genomics* 23, 405. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08642-1>
- Yoshida, Y., Satoh, T., Ota, C., Tanaka, S., Horikawa, D.D., Tomita, M., Kato, K., Arakawa, K., 2020. A novel Mn-dependent peroxidase contributes to tardigrade anhydrobiosis. <https://doi.org/10.1101/2020.11.06.370643>
- Yoshida, Y., Sugiura, K., Tomita, M., Matsumoto, M., Arakawa, K., 2019. Comparison of the transcriptomes of two tardigrades with different hatching coordination. *BMC Dev. Biol.* 19, 24. <https://doi.org/10.1186/s12861-019-0205-9>
- Zeman, M.K., Cimprich, K.A., 2014. Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16, 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>
- Zhang, J., Kim, J., Alexander, A., Cai, S., Tripathi, D.N., Dere, R., Tee, A.R., Tait-Mulder, J., Di Nardo, A., Han, J.M., Kwiatkowski, E., Dunlop, E.A., Dodd, K.M., Folkerth, R.D., Faust, P.L., Kastan, M.B., Sahin, M., Walker, C.L., 2013. A TSC signaling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.* 15, 1186–1196. <https://doi.org/10.1038/ncb2822>
- Zhang, Y., Lozano, G., 2017. P53: multiple facets of a rubik's cube. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 1, 185–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-050216-121926>