Méthodes et Protocoles - PSE Tardigrades

Noelia MERINO, Justine RAKOTOMALALA et Henri VO VAN QUI

2019-2020

Introduction

Le tardigrade est une espèce extrémophile renommée, dont les premières observations remontent au 17ème siècle. Grâce à sa capacité de mise en cryptobiose (il s'agit de la capacité du tardigrade à remplacer toute l'eau de son corps par un sucre, le tréhalose) le tardigrade peut alors résister à des pressions élevées, le vide intersidéral, une dose de rayon gamma 2000 fois supérieure à celle supportée par les humains, des températures extrêmes... Il existe plus de 2000 espèces différentes de tardigrades, et chacune possède des résistances qui lui sont propres.

L'objectif de ce PSE est de préciser les caractéristiques de mise en cryptobiose d'une espèce : *Hypsibius exemplaris*. La démarche sera la suivante : mise en place d'un protocole d'échantillonage précis des tardigrades, observation qualitative du passage en cryptobiose, et enfin une étude des critères cinétiques et thermodynamiques de la mise en cryptobiose.

1 Manipulation des tardigrades

1.1 Achat et culture des tardigrades

Les temps de reproduction des tardigrades étant trop longs, nous avons acheté nos tardigrades sur le site anglais Sciento (https://www.sciento.co.uk/). Ils proposaient à l'époque 3 espèces différentes : *Hypsibius Exemplaris*, *Macrobiotus Macronix* et *Dactylobiotus Dispar*.

Nous avons décidé de faire nos expériences sur *Hypsibius Exemplaris* car le plus commun, mais nous avons également utilisé *Macrobiotus Macronix* pour des observations du fait de sa grande taille (1 mm) comparée aux autres espèces et *Dactylobiotus Dispar* pour comparer quelques paramètres.

1.2 Prélèvement des tardigrades

Le milieu dans lequel se trouvent les tardigrades est rempli d'algues. Pour mieux les observer ou pour faire des expériences sur eux, il faut les prélever mais cela n'est pas aisé du fait de leur petite taille. Nous avons mis au point un protocole pour les prélever efficacement :

- Déposer avec une micro-pipette une goutte d'eau de quelques microlitres (plus de 3 μL) sur une plaque de verre propre.
- Prélever grossièrement 1 mL de tardigrades avec leur milieu, les mettre sur une autre plaque de verre et les observer sous loupe binoculaire.
- Régler une micro-pipette sur 2 ou 3 μL.
- Isoler un individu et approcher doucement la pointe de la micro-pipette. L'aspirer et le déposer dans la première grosse goutte, préalablement déposée sur la plaque de verre.

– Recommencer ainsi pour concentrer plus de tardigrades dans la goutte. Avec un peu d'entraînement, on peut aspirer 2 ou 3 tardigrades ensemble dans une seule goutte de 2 μL et les déposer dans la grosse goutte.

1.3 Observation des tardigrades

Les tardigrades sont des organismes dont la taille varie entre 1 μm et 1 mm. Leur observation nécessite donc une loupe binoculaire. Étant transparents, nous avons constaté qu'il était pratique des les observer avec la lumière du dessous de la loupe binoculaire. Pour les trouver :

– Déposer une goutte de quelques mL de leur milieu préalablement secoué (les algues et les tardigrades ont tendance à tomber au fond du flacon) sur une plaque de verre propre.
– Régler la loupe binoculaire sur le grossissement le plus faible et repérer du mouvement.
– Régler la résolution puis augmenter le grossissement.

Il n'est pas toujours judicieux d'augmenter le grossissement au maximum. D'une part, la luminosité diminue et d'autre part, les tardigrades se déplacent trop vite pour rester suffisamment longtemps dans le champ de vision pour être observés.

Figure 1 : Loupe binoculaire pour l'observation des tardigrades

2 Description des montages expérimentaux

2.1 Montage pour tester la résistance à la température

Afin de tester la résistance des tardigrades à la température, nous avons utilisé une plaque chauffante. Le principe est de placer une goutte d'eau contenant des tardigrades (en suivant le protocole du paragraphe 1.2) dans un petit cristallisoir en verre sur la plaque chauffante, et de les laisser à une certaine température pendant quelques minutes. Pour tester la résistance des tardigrades hors état de cryptobiose, nous nous sommes penchés sur la gamme de température 25°C - 40°C. La température était suivie avec un thermomètre.

Figure 2 : Montage pour tester la résistance à la température

2.2 Cloche à humidité contrôlée

Afin de diminuer la vitesse d'évaporation des gouttes, nous avons placé nos tardigrades dans une cloche à vide avec deux cristallisoirs remplis d'eau préalablement portée à ébullition. Cela permet d'avoir un taux d'humidité allant jusqu'à 90 % (taux mesuré avec un hygromètre, dont le capteur était glissé sous la cloche).

Figure 3 : Cloche à humidité contrôlée

Au cours de notre projet, nous avons pensé à d'autres montages expérimentaux. Nous ne les avons pas retenus pour nos observations, mais nous souhaitions tout de même les présenter.

2.3 Pelletier intégré à une loupe binoculaire

Nous avons voulu créer un dispositif chauffant mais qui nous permettait quand même d'observer les tardigrades pendant qu'ils chauffaient. Pour cela nous avons pensé à intégré un pelletier à notre loupe binoculaire.

Un pelletier a été collé sous la plaque d'observation de la loupe binoculaire, face chauffante vers le haut et face froide vers le bas. Les câbles d'alimentation du pelletier furent relié à un générateur en passant par le pieds de la binoculaire.

Malheureusement, dans ce montage, nous ne pouvions qu'observer les tardigrades en utilisant la lumière supérieure de la binoculaire ce qui n'était pas idéal. De plus, le pelletier de permettait pas de chauffer suffisamment les tardigrades. Nous avons donc dû revenir au premier montage utilisant une plaque chauffante, même si cela ne permettait pas d'observer les tardigrades "en direct".

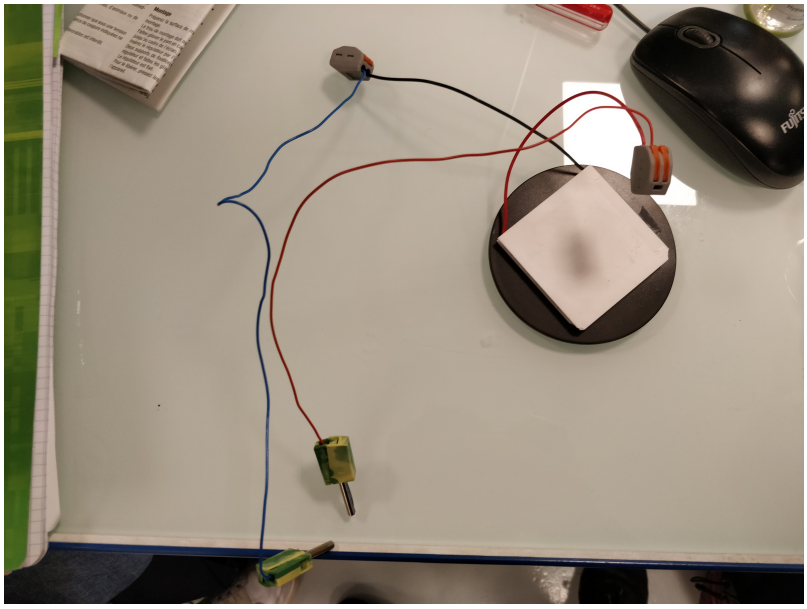

Figure 4 : Pelletier fixé sous la plaque de la binoculaire (vu de dessous)

3 Bibliographie

[1] CZERNEKOVA, Michaela et JÖNSSON, K. Ingemar. *Experimentally induced repeated anhydrobiosis in the eutardigrade Richtersius coronifer.* PLoS one, 2016, vol. 11, no 11.

[2] HENGHERR, S., BRÜMMER, F., et SCHILL, R. O. *Anhydrobiosis in tardigrades and its effects on longevity traits.* Journal of Zoology, 2008, vol. 275, no 3, p. 216-220.

[3] BERTOLANI, Roberto, GUIDETTI, Roberto, JÖNSSON, Ingemar K., et al. *Experiences with dormancy in tardigrades.* Journal of Limnology, 2004, vol. 63, no 1s, p. 16-25.

4 Conclusion

Si le tardigrade demeure une espèce extrémophile, il n'en demeure pas moins que le passage en cryptobiose est un véritable coût énergétique pour l'animal, et qu'en conséquence non seulement cela nécessite un délais de mise en oeuvre non négligeable pour l'animal, mais aussi le réveil du tardigrade n'est pas garanti. En conséquence, si l'échantillonnage des tardigrades (bien que fastidieux) s'avère facile une fois le protocole mis en place, l'observation d'un passage en cryptobiose demeure plus ardu dans le temps des séances de PSE. Cet obstacle a amené à recentrer les objectifs vers la réversibilité de la cryptobiose.