

# Caractérisation des effets électrique et chimique du plasma froid atmosphériques sur les tardigrades

Porteurs du projet doctoral : T. Dufour (LPP/SU), E. Delagoutte (STRING/MNHN)

## Contexte

Les tardigrades appartiennent à un phylum de micro-animaux segmentés vivant dans l'eau. Survivants des cinq extinctions massives ayant marqué la Terre, les tardigrades sont parmi les animaux les plus résistants connus à ce jour, capables de survivre à des stress extrêmes, qu'ils soient naturels (température, déshydratation, famine) ou artificiels (absence d'oxygène, pression d'ultravide, irradiations gamma) [1]. Pour s'adapter à ces conditions, les tardigrades réduisent leurs activités métaboliques à un niveau indétectable, entrant ainsi dans une forme extrême de quiescence appelée cryptobiose [2].

En 2022, le LPP (Laboratoire de Physique des Plasmas) de SU et le laboratoire STRING (Structure et Instabilité des Génomes) du MNHN ont initié des travaux de recherche interdisciplinaire visant à contrôler et comprendre les mécanismes de dormance des tardigrades en utilisant une approche de traitement exploratoire : les plasmas froids atmosphériques (PFA). Ces gaz faiblement ionisés peuvent être facilement générés par des décharges électriques dans l'air ambiant et sont constitués d'électrons, d'ions, d'espèces réactives (OH<sup>•</sup>, O<sup>•</sup>, O<sub>3</sub>, NO<sup>•</sup>, ...) et énergétiques qui leur confèrent des propriétés exceptionnelles. Si les PFA ont déjà été étudiés pour décontaminer une grande diversité de biofilms [3], leur utilisation inverse pour stimuler l'activité de microorganismes ou de micro-animaux reste un domaine de recherche totalement vierge dans le cadre d'enjeux écologiques.

## Résultats préliminaires

La Figure 1a montre une population de 500 tardigrades appartenant à l'espèce *Hypsibius exemplaris* (espèce cosmopolite vivant sous nos latitudes) dans leur milieu aqueux (eau minéralisée) exposée à une décharge spark de plasma froid créée avec de l'hélium. Un tel traitement a conduit aux résultats présentés sur la Figure 1b qui dénombre la proportion de tardigrades vivants pour différentes valeurs de courant de plasma (1,5 mA, 3 mA, 6 mA et 9 mA) et suivant trois stratégies d'applications qui permettent de combiner ou dissocier les effets électriques/chimiques générés par le plasma froid en phase aqueuse. Ainsi, il apparaît que le stress électrique du PFA n'induit pas d'effet secondaire sur la survie des tardigrades et ce même pour des valeurs de courant et tension de 9 mA et 6000 V respectivement (Figure 1b, barres noires). En revanche, les espèces chimiques générées par le plasma froid en phase aqueuse induisent des effets délétères, la survie des animaux passant de 95% (pour I = 1,5 mA) à 0.9% (pour I = 9 mA) (Figure 1b, barres rouges).

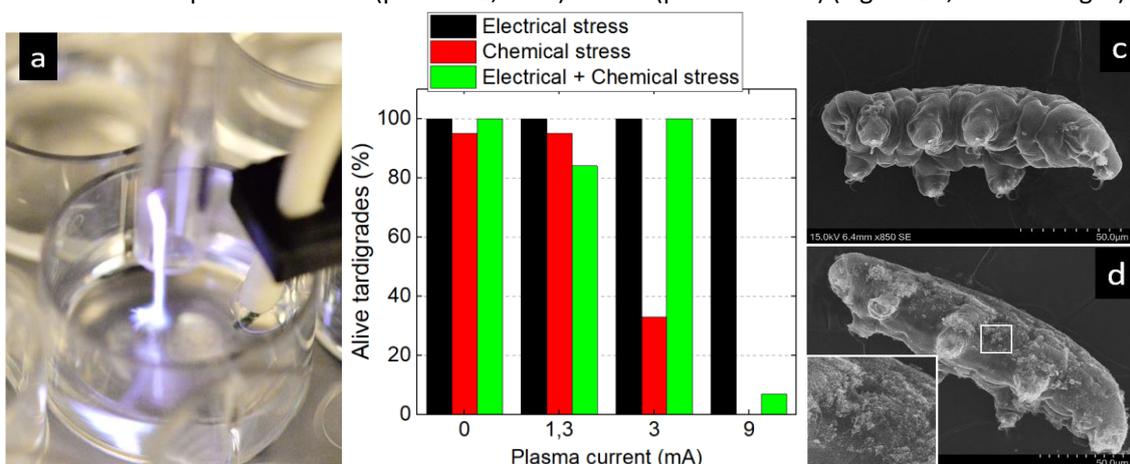


Figure 1. (a) Image d'un puits contenant 500 *Hypsibius exemplaris* dans 2 mL de Volvic exposés à une décharge de PFA. (b) Proportion de tardigrades vivants en fonction du courant électrique délivré par le PFA. Images MEB avant (c) ou après (d) traitement PFA.

Etonnamment, la combinaison des deux effets – électrique et chimique – conduit à un résultat intermédiaire en termes de survie, indiquant que les composantes électrique et chimique du plasma agissent de manière antagoniste : la première réduisant les effets néfastes de la deuxième (Figure 1b, barres vertes). Même s'il induit les mêmes effets délétères mais à des doses plus faibles, le plasma froid généré

avec de l'argon présente également des effets antagonistes, le stress électrique protégeant du stress chimique : par exemple, pour  $I = 1,5 \text{ mA}$  et  $6000 \text{ V}$ , la survie passe de 0% pour le stress "chimique" pur à 70% pour le stress "chimique + électrique". 100% de survie est mesuré pour le stress "physique" pur. Par ailleurs, des observations en microscopie électronique à balayage indiquent que les tardigrades exposés au PFA pendant 5 minutes subissent une érosion de leur cuticule (Figures 1c et 1d).

Ces résultats préliminaires posent de nombreuses questions et ouvrent la voie au projet doctoral décrit ci-dessous.

## Objectifs de la thèse

Les objectifs de la thèse visent à répondre à trois questions.

### **1. L'effet antagoniste des composantes chimique et électrique du plasma froid est-il observé avec d'autres espèces de tardigrades; le cas échéant, dans quelles proportions ?**

L'étude comparative se justifie par le fait que les capacités de résistance des tardigrades sont variables d'une espèce à l'autre, les laboratoires GE2R et GPA de l'unité STRING ayant montré une plus grande résistance d'*Acutuncus antarcticus* (espèce endémique de l'Antarctique) à la dessiccation ou aux radiations ionisantes qu'*Hypsibius exemplaris*. En suivant le protocole développé par les laboratoires GPA et LPP, la/le doctorant(e) étendra l'analyse réalisée sur *Hypsibius exemplaris* non seulement à *Acutuncus antarcticus* mais également à une autre espèce cosmopolite, *Paramacrobiotus fairbanksi*, élevée dans l'unité STRING, qui contrairement à *Hypsibius exemplaris* et *Acutuncus antarcticus* qui sont de la famille des *Hypsibiidae*, appartient à une autre famille, la famille des *Macrobiotidae*. Cette analyse comparative sera intégrée et confrontée aux approches de génomiques comparatives développées dans l'unité STRING par l'équipe GE2R.

### **2. Quels sont les mécanismes à l'origine de l'effet antagoniste des composantes chimique et électrique du plasma froid ?**

#### **a. Caractérisation des plasmas froids atmosphériques (PFA) et des liquides activés par plasma (LAP)**

Les tardigrades en milieu aqueux seront exposés au PFA généré par la source spark (Figure 1). Celle-ci sera alimentée par un mélange de gaz vecteur (hélium ou argon) avec/sans gaz réactif ( $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ , vapeur d'eau) pour moduler la production d'espèces réactives. Puis, la/le doctorant(e) procédera à la caractérisation des espèces actives du PFA en combinant des analyses de spectrométrie de masse et de spectroscopie d'émission optique. Il/elle caractérisera également les milieux aqueux (sans les tardigrades) en suivant les protocoles développés au LPP [4]. Ainsi, les paramètres chimiques (pH, potentiel redox, conductivité) et les concentrations des espèces réactives à longue durée de vie (nitrites, peroxyde d'hydrogène, ozone, etc.) seront caractérisés avant/après exposition au PFA.

#### **b. Caractérisation de la cuticule par microscopie électronique à balayage (MEB)**

À forte dose (5 minutes, 12 mA), le plasma induit une érosion de la cuticule des tardigrades visible par MEB (Figures 1c et 1d). Le/la doctorante poursuivra ces investigations structurales notamment pour des faibles doses de plasma (temps, courant) en utilisant la plate-forme de MEB du MNHN. La composition chimique de la cuticule sera également caractérisée par une analyse MEB-EDX. D'une manière surprenante, des résultats antérieurs avaient révélé une forte teneur relative en soufre de la cuticule d'*Hypsibius exemplaris* (Emmanuelle Delagoutte, communication personnelle). Cette caractéristique mérite d'être revisitée dans le contexte du projet étant donné la participation de molécules soufrées (e.g. glutathion) dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène. Nous émettons en effet l'hypothèse que le stress électrique délivré par le PFA modifie la cuticule de l'animal, qui devient alors un piège aux espèces réactives de l'oxygène induites par le PFA. Une analyse semi-quantitative par MEB-EDX permettra de tester cette hypothèse.

#### **c. Caractérisation des structures intra-cellulaires**

L'exposition de cellules eucaryotes à une variété de stress conduit en général à une réorganisation de la cellule, avec l'apparition d'agrégats cytoplasmiques visibles en microscopie électronique en transmission (MET) [5] et de nouvelles organelles (e.g. GS, P bodies [6]) mis en évidence par immunofluorescence (IF) ou microscopie immuno-électronique (MIE). Le/la doctorant(e) caractérisera les réorganisations cytoplasmiques et nucléaires des cellules de tardigrades suite au stress PFA, et apportera une attention particulière à l'assemblage de granules de stress (GS), entités cytoplasmiques dynamiques dépourvues de membrane, composées de protéines et d'ARN qui s'assemblent dans la cellule suite à un stress. Les

expériences de MET permettront de comparer sans a priori l'ultrastructure cytoplasmique et nucléaire de tardigrades traités ou non. Les GS seront en parallèle recherchés par MIE et IF en utilisant la protéine PABP1 (poly(A) binding protein 1) d'*Hypsibius exemplaris* (HePABP1), comme marqueur modèle très conservé des GS (7).

#### d. Caractérisation de la protéine HePABP1 *in vitro* et *in vivo*

La participation de PABP1 à l'assemblage de GS *via* un possible phénomène de séparation de phase a été caractérisé chez la levure [8] et sera étudiée *in vitro* par des approches de biochimie moléculaire et structurale et *in vivo* en introduisant le gène codant pour la protéine HePABP1 dans la levure *S. cerevisiae*. Cette étude sera étendue à d'autres marqueurs protéiques en purifiant les GS spécifiquement assemblés après traitement PFA, et aux deux autres espèces de tardigrades élevées au laboratoire.

À noter que l'unité STRING dispose d'un service commun de microscopie de fluorescence et est associée au fonctionnement de la plateforme de microscopie photonique du MNHN. Les expériences de MET et MIE seront effectuées sur la plateforme ImagoSeine de l'Institut Jacques Monod avec laquelle l'équipe GPA a commencé une collaboration. De plus l'équipe GPA maîtrise la génétique moléculaire de la levure pour la réalisation des expériences d'expression de protéines de tardigrades chez *S. cerevisiae*. Emmanuelle Delagoutte possède l'expertise en purification et biochimie des protéines.

### **3. Peut-on exploiter l'effet antagoniste des composantes chimique et électrique du plasma froid pour améliorer les capacités de survie et de reproduction de certaines espèces de tardigrades en administrant le PFA sous la forme d'un pré-conditionnement ?**

Sur la base des résultats préliminaires présentés en Figure 1, nous formulons l'hypothèse selon laquelle le PFA pourrait être administré aux tardigrades sous forme d'un « pré-conditionnement », afin de les renforcer face aux conditions de stress. Le/la doctorant(e) aura pour objectif de vérifier cette hypothèse en exposant les tardigrades au PFA (phase de pré-conditionnement) puis en les soumettant à divers stress naturels. Le taux de survie ainsi que la capacité de reproduction en sortie de la cryptobiose seront mesurés. La dessiccation sera utilisée comme modèle de stress naturel, étant donné que la technique d'entrée et de sortie d'anhydrobiose est maîtrisée par le laboratoire GPA. De plus, les mesures de taux de survie et de la capacité de reproduction des tardigrades se font en routine dans l'équipe GPA.

[1] M. Cesari et al., *Insects*, 13, 634 (2022), <https://doi.org/10.3390/insects13070634>

[2] R. Guidetti et al., *Journal of Insect Physiology* Vol. 57, pp. 567–576 (2011), [www.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.003](http://www.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.003)

[3] T. T. Gupta et al., *Appl. Sci.*, Vol. 9, 3548 (2019), [www.doi.org/10.3390/app9173548](http://www.doi.org/10.3390/app9173548)

[4] F. Judée, S. Simon, C. Bailly, T. Dufour, *Water Research* 133 (2018) 47-59, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.035>

[5] S. Souquere et al., *Journal of Cell Science*, 122, pp:3619-3626, (2009), <https://doi.org/10.1242/jcs.054437>

[6] Kilchert et al. *Molecular Biology of the Cell*, 21, pp:2624-2638. (2010), <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-02-0099>

[7] Brambilla et al. *Yeast* 36(1) pp:23-34. (2017), <https://doi.org/10.1002/yea.3347>

[8] Riback et al. *Cell* 168, pp:1028-1040. (2017), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.027>

### **Diagramme de Gant**

	Année 1		Année 2		Année 3	
Effets des PFA sur <i>Acutuncus antarcticus</i> et <i>Paramacrobiotus fairbanski</i>	X	X				
Caractérisation des PFA et des liquides activés par plasma (LAP)	X	X	X			
Caractérisation de la cuticule par microscopie électronique à balayage		X	X			
Caractérisation des structures intra-cellulaires			X	X	X	
Evaluation d'un pré-traitement au PFA sur la survie et la reproduction après dessiccation			X	X	X	
Écriture des publication(s) et thèse					X	X