



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Contribution à l'étude des interactions hôte-parasite chez *Adineta vaga*, une espèce de rotifère bdelloïde

Renoz, Francois

Award date:
2009

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

François Renoz
Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie
Université Catholique de Louvain



UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX (NAMUR)

FACULTÉ DES SCIENCES

**Contribution à l'étude des interactions hôte-parasite
chez *Adineta vaga*, une espèce de rotifère bdelloïde**

Composition du jury :

K. Van Doninck (Promoteur, FUNDP)
E. Depiereux (FUNDP)
J.P Descy (FUNDP)
T. Hance (UCL)

Année académique 2007-2008

Abstract

The great majority of the animals are sexual. Their lifecycle includes a stage at which genes from two parents are recombined to form offsprings with new gene combinations. According many hypotheses, these new combinations could represent an evolutionary advantage by accelerating adaptation to various abiotic and biotic stresses such as exposition to parasites. At the opposite of sexual organisms, exclusive asexual organisms tend to have a short evolutionary lifespan because the lack of innovating gene combinations. Nevertheless, bdelloid rotifers seem to contradict this assertion. It is why they were called "ancient asexual scandal" by John Maynard Smith. These hyper-abundant microscopic animals live in aquatic and semi-aquatic habitats such as ponds, streams, mosses and lichens. They are well-known for their ability to enter a state called anhydrobiosis in which they can stay for several years to be active again when environmental conditions become better. This class of rotifers exhibits no traces of male and meiosis and consists entirely in female reproducing by apomixes in which diploid eggs produced by amitotic division developed parthenogenetically into females.

Surprisingly, the Red Queen seems to hold little power on bdelloid rotifers. This hypothesis is intended to the advantage of sexual reproduction at the level of individuals, and the constant evolutionary arms race between antagonistic organisms such as parasites and their hosts. But despite many studies on bdelloids evolution and some descriptions of bdelloids parasites, very little is known of their interactions with parasites.

During my master thesis, I tried to explore the short-term responses of one bdelloid species, *Adineta vaga* to infection by one fungal parasite *Rotiferophthora angustispora*. Firstly, I followed the evolution of several populations of 30 individuals initially during several weeks. Observations and statistical analyses show that the inoculation effect tend to decrease during the time and that female could adjust its allocations to reproduction by laying more eggs with reference to nonstress conditions. Moreover, Bdelloids seem to avoid the parasite by adopting morphology changes. Secondly, scanning electron microscopic was used to compare the shape taken by starved forms, desiccated forms and stressed forms by the parasite. Observations seem to show that the shape differ as a function of the kind of stress. Future studies using life tables should be used to confirm or invalidate some results and to deepen impact of parasitism on bdelloid life history traits.

Résumé

La grande majorité des animaux sont sexués. Leur cycle de vie comprend une étape au cours de laquelle les gènes de deux parents sont recombinaisonnés pour former des descendants caractérisés par de nouvelles combinaisons de gènes. Ces dernières pourraient représenter un avantage évolutif en accélérant l'adaptation à divers stress abiotiques et biotiques tels que l'exposition à un parasite. Contrairement aux sexués, les asexués sans exception (c'est-à-dire qui ne présentent pas de phase sexuée durant leur cycle de vie) ont tendance à avoir une courte durée de vie évolutive à cause de l'absence de nouvelles combinaisons génétiques. Néanmoins, les rotifères bdelloïdes semblent contredire cette affirmation. C'est la raison pour laquelle ils ont été qualifiés d'« ancien asexual scandal » par John Maynard Smith. Ces animaux microscopiques vivent dans les milieux aquatiques et semi-aquatiques tels que les étangs, les rivières, les mousses et les lichens. Ils sont bien connus pour leur capacité à entrer dans un état appelé anhydrobiose dans lequel ils peuvent rester durant plusieurs années pour à nouveau être actifs lorsque les conditions environnementales deviennent meilleures. Cette classe de rotifères ne présente aucune trace de mâle ou de méiose et est donc entièrement constituée de femelles qui se reproduisent par apomixie au cours de laquelle des oeufs diploïdes sont produits par division amictique et se développent parthénogénétiquement en femelles.

Etonnamment, la Reine Rouge ne semble pas avoir beaucoup d'effet sur les Bdelloïdes. Selon cette hypothèse, la reproduction sexuée représente un avantage dans la course à l'armement constante qui existe entre organismes antagonistes tels que les parasites et leurs hôtes. Cependant, malgré de nombreuses études sur l'évolution des Bdelloïdes et quelques descriptions de parasites, on connaît très peu leurs interactions avec ceux-ci.

Au cours de ce mémoire, j'ai tenté d'étudier les réponses à court-terme d'une espèce de Bdelloïde, *Adineta vaga*, face à un parasite fongique, *Rotiferophthora angustispora*. Dans un premier temps, j'ai suivi l'évolution de plusieurs populations initialement composées de 30 individus durant plusieurs semaines. Les observations et les analyses statistiques montrent que l'effet de l'inoculation diminue au cours du temps et que les femelles ajustent leur allocation à la reproduction en pondant plus d'œufs par rapport aux conditions d'absence de stress. De plus, les Bdelloïdes semblent éviter le parasite en adoptant des modifications morphologiques. Dans un deuxième temps, la microscopie électronique à balayage a été utilisée pour comparer l'apparence prise par les formes stressées résultant d'une absence de nourriture, d'une dessiccation et d'une exposition à un parasite. Les observations semblent montrer que la morphologie diffère en fonction du type de stress. Dans de futures études, l'utilisation de tables de survie permettrait de confirmer ou d'infirmer certains résultats et d'approfondir l'impact du parasitisme sur les traits d'histoire de vie et sur le fitness de l'hôte.

Tout d'abord, ma reconnaissance va à ma promotrice, Madame Karine Van Doninck pour ses conseils, son enthousiasme et pour l'accueil qui m'a été réservé lorsque je suis arrivé en URBO.

En second lieu, je tiens à remercier chaleureusement Fabien Rubay pour son aide et ses conseils, mais également pour sa bonne humeur et son humour de tous les jours.

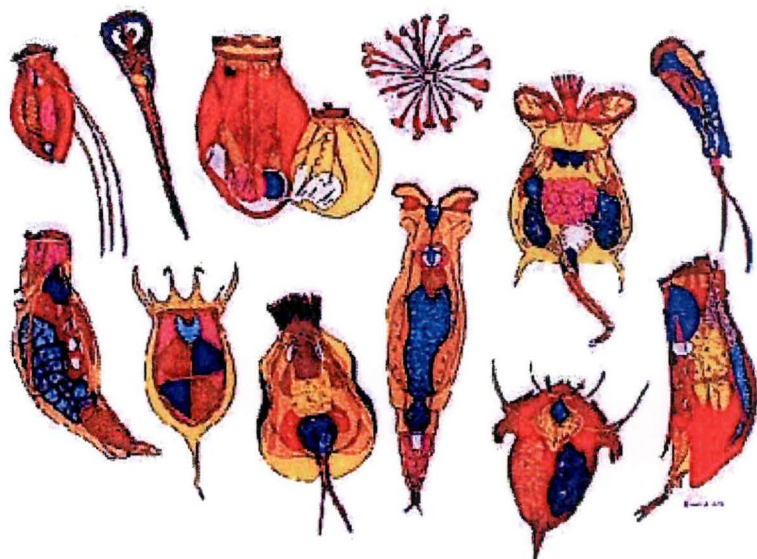
Merci également à Messieurs Eric Depiereux et Benoît de Hertogh qui m'ont apporté, à plusieurs reprises, leur aide dans les analyses statistiques.

Merci à Monsieur Jean-Pierre Descy, merci à Lise-Marie, Anne-Laure, François, Bruno, André, Amélie, Stéphanie, Sylvain, Annick, Neil, Gersande, Frédéric, Kathleen et tous les autres pour la chouette ambiance au sein de l'Unité de recherche.

Merci à l'ensemble du service de microscopie électronique, Renaud, David et Marie-Jeanne, pour leur aide.

Merci à Monsieur Patrick Kestemont pour les informations reçues en troisième baccalauréat et qui m'ont permis de m'orienter vers ce master en biologie des organismes et écologie. Merci à l'ensemble de tous les organisateurs de ce programme commun entre l'UCL et les FUNDP.

Enfin, merci à ma famille et à mes amis Jonathan, Pompon, Benoît et Bernard pour leur soutien.



Un carnaval de rotifères (par Berkeley Bayne)

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	3
I. Introduction générale au phylum Rotifera	4
1) Généralités	4
2) Morphologie, anatomie et physiologie	4
3) Biogéographie	5
4) Reproduction et cycle de vie	6
II. Evolution des Bdelloïdes	7
1) Les avantages de la sexualité	7
2) L'évolution des Bdelloïdes	8
a. <i>Les Bdelloïdes, scandales de l'évolution</i>	8
b. <i>Asexualité des Bdelloïdes et tétraploïdie</i>	9
c. <i>La notion d'espèces chez les asexués</i>	10
d. <i>Les transferts horizontaux de gènes chez les Bdelloïdes</i>	11
3) Conséquences évolutives de l'asexualité des Bdelloïdes	11
4) Les Bdelloïdes, véritables scandales évolutifs ?	12
III. La dormance chez les rotifères bdelloïdes	12
1) La dormance dans le règne animal	12
2) La dormance chez les Bdelloïdes	14
a. <i>Les rotifères et la dormance</i>	14
b. <i>Les mécanismes mis en place par les Bdelloïdes pour lutter contre la dessiccation</i>	15
c. <i>L'impact de l'anhydrobiose sur le fitness</i>	16
IV. Le parasitisme chez les Bdelloïdes	17
1) Les interactions microbiennes	17
2) Les conséquences du parasitisme sur l'hôte	18
a. <i>Les premières défenses d'un hôte face à un parasite</i>	18
b. <i>L'impact du parasitisme sur les traits d'histoire de vie et sur le fitness de l'hôte</i> 18	18
c. <i>Parasitisme et régulation des populations hôtes</i>	20
3) La théorie de la Reine Rouge	20
4) Le parasitisme chez les rotifères Bdelloïdes	21
a. <i>La reproduction sexuée, source de diversité génétique</i>	21
b. <i>Les parasites fongiques</i>	22
c. <i>Le genre Rotiferophthora</i>	23
V. Objectifs du présent travail	23
2. MATERIEL ET METHODES	25
I. Matériel biologique et analyses génétiques	26
1) Les cultures de Bdelloïdes	26
2) Les analyses génétiques	27
a. <i>Choix du marqueur moléculaire</i>	27
b. <i>Extraction de l'ADN</i>	27
c. <i>Choix des amorces</i>	28
d. <i>Amplification du marqueur</i>	28

e.	<i>Electrophorèse sur gel d'agarose</i>	29
f.	<i>Séquençage et alignement</i>	29
II.	Observations écologiques.....	29
1)	Cultures.....	29
a.	<i>Le champignon parasite <i>Rotiferophthora angustispora</i></i>	29
b.	<i>La nourriture</i>	30
c.	<i>Période d'acclimatation</i>	30
2)	Suivi des populations soumises à différents stress.....	31
a.	<i>Dispositif expérimental</i>	31
b.	<i>Paramètres évalués</i>	31
c.	<i>Le comptage</i>	32
d.	<i>Les analyses statistiques</i>	33
3)	Protocole de dessiccation.....	34
III.	Analyse microscopique.....	34
1)	Microscopie photonique.....	34
2)	Microscopie électronique à balayage.....	34
a.	<i>Préparation du fixateur FGP</i>	34
b.	<i>Création d'un support</i>	35
c.	<i>La préparation des échantillons</i>	35
d.	<i>Le contournement du point critique</i>	36
e.	<i>La métallisation</i>	37
f.	<i>Les observations</i>	37
3.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	38
I.	Vérification de la clonalité des cultures.....	39
1)	Vérification de la clonalité.....	39
2)	Identification de l'espèce modèle.....	39
II.	Observations écologiques.....	40
1)	Evolution des différents paramètres au cours du temps.....	40
a.	<i>Evolution du nombre d'individus actifs au cours du temps</i>	40
b.	<i>Evolution du pourcentage d'individus morts et du pourcentage d'individus vivants au cours du temps</i>	42
c.	<i>Evolution du pourcentage d'individus stressés au cours du temps</i>	44
d.	<i>Evolution du nombre d'œufs produits par femelle active au cours du temps</i> ...	45
e.	<i>Evolution du nombre du pourcentage d'individus infectés au cours du temps</i>	46
2)	Analyse approfondie des deux composantes du fitness.....	47
a.	<i>Introduction</i>	47
b.	<i>Evolution du pourcentage d'individus vivants au cours du temps</i>	48
c.	<i>Evolution du nombre d'œufs produits par femelle active au cours du temps</i> ...	49
3)	Evaluation de l'hypothèse d'adaptation.....	50
4)	Synthèses des observations : réactions de défense face au parasitisme.....	52
III.	Réponse morphologique à différents stress.....	53
1)	Utilisation de la microscopie photonique.....	53
2)	Utilisation de la microscopie électronique à balayage.....	54
a.	<i>Réponse morphologique à la dessiccation</i>	54
b.	<i>Réponse morphologique liée à un manque de nourriture prolongé</i>	55
c.	<i>Réponse morphologique liée à l'exposition d'un parasite</i>	55
d.	<i>Comparaison des trois types de réponses morphologiques</i>	56
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	59
5.	BIBLIOGRAPHIE.....	63

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

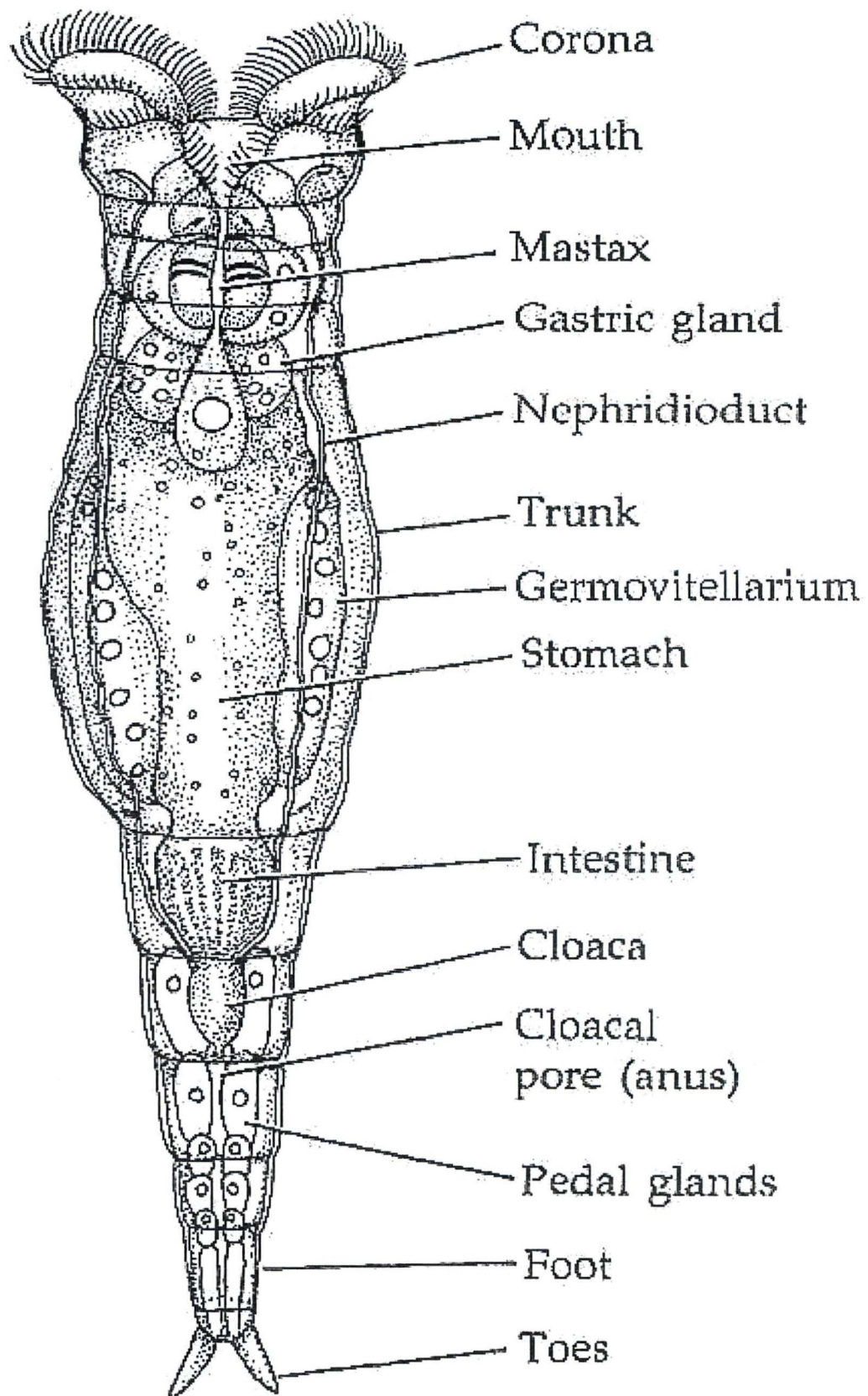


Fig. 1. Anatomie générale d'un Bdelloïde. (d'après Brusca et Brusca).

I. Introduction générale au phylum Rotifera

1) Généralités

Les rotifères sont des métazoaires microscopiques aquatiques observés pour la première fois par les premiers microscopistes à la fin du 17^{ème} siècle et dont la taille oscille entre 100 et 600 µm (certaines espèces peuvent dépasser le mm). On compte actuellement environ 1800 espèces décrites réparties en trois classes : la classe des Monogonontes, la classe des Bdelloïdes et la classe des Seisonides. Les Monogonontes constituent le groupe le plus large, avec 1500 espèces environ, tandis que le groupe des Bdelloïdes comprend environ 460 espèces (Segers, 2007). On ne connaît à l'heure actuelle que trois espèces appartenant à la classe des Seisonides.

Le terme « rotifère » (du latin rota, « roue » et ferre, « porter ») est issu des deux couronnes de cils qui entourent leur bouche et qui tourbillonnent afin de faire entrer l'eau chargée en particules nutritives au niveau du tube digestif. Malgré leur petite taille, les rotifères peuvent présenter une multitude de formes corporelles. Définis comme des triploblastiques, bilatéraux et pseudocoelomates non-segmentés, la plupart d'entre eux sont solitaires. De nombreuses informations contenues dans cette introduction générale au phylum Rotifera sont issues de l'ouvrage de Brusca et Brusca (2003).

2) Morphologie, anatomie et physiologie

Malgré une petite taille et un petit nombre de cellules, les rotifères sont des organismes dotés d'une morphologie assez complexe (**Fig. 1**). Leur corps est généralement divisé en trois régions principales : la tête, le tronc et le pied (Ricci et Melone, 2000). Les rotifères sont pourvus d'un système digestif complet qui commence par la bouche et se termine par l'anus. La bouche est pourvue d'une structure ciliaire appelée la corona qui permet aux rotifères de se nourrir en entraînant le transfert de particules nutritives présentes dans l'eau au niveau du tube digestif. La corona permet également à certaines espèces de se déplacer. La bouche mène au pharynx appelé mastax. Ce dernier est un muscle qui renferme des pièces dures constituant un jeu de mâchoires internes baptisées trophi : la structure de la corona et des trophi détermine le type de régime alimentaire de l'espèce. En outre, les trophi sont essentiels en taxonomie. Le

mastax et l'estomac sont connectés par un œsophage de courte taille. Un intestin, de courte taille également, relie l'estomac à l'anus.

Bien que certains rotifères soient sessiles, la plupart sont mobiles et peuvent se déplacer activement en nageant ou en rampant. La nage est assurée par les battements des cils formant la corona, tandis que la faculté qu'ont certaines espèces à ramper est assurée par la partie terminale postérieure du corps constituée d'un pied. Ce dernier est pourvu d'une glande sécrétrice permettant au rotifère de s'attacher de manière temporaire au substrat ou de se déplacer.

En revanche, les rotifères sont dépourvus de système circulatoire. Après digestion, les substances nutritives traversent la paroi de l'estomac et de l'intestin et circulent dans le pseudocœle où elles alimentent toutes les cellules de l'animal. Ces dernières rejettent les déchets métaboliques dans le liquide pseudocœlomique qui est alors filtré au niveau de protonéphridies, assurant à la fois l'excrétion et l'osmorégulation du milieu intérieur.

L'ensemble des rotifères est pourvu d'un système excréteur du type protonéphridien et d'un système nerveux primitif comprenant un ganglion cérébroïde. Les organes sensoriels se composent d'un ou de plusieurs ocelles, de fossettes ciliées et de soies tactiles.

3) Biogéographie

Les rotifères colonisent des biotopes aquatiques ou péri-aquatiques variés, du sol humide au milieu marin. En eau douce, la majorité des rotifères appartiennent à la classe des Monogonontes. Les espèces qui vivent en mer appartiennent à la classe des Seisonides et à la classe des Monogonontes. Dotés d'une faculté de survie en conditions extrêmes de gel et d'assèchement, les Bdelloïdes composent la majorité des peuplements du sol et des mousses et leur répartition géographique est donc très importante. Les quelques espèces de Bdelloïdes qui se développent dans les eaux douces appartiennent aux genres *Rotatoria* et *Philodina*.

La répartition des rotifères est essentiellement liée à la nature des biotopes aquatiques et non à la région géographique. La plupart des espèces se retrouvent en fait aussi bien dans des biotopes semblables d'Afrique, d'Amérique, d'Asie ou d'Europe. Néanmoins, certaines espèces sont limitées à une aire géographique précise (Fontaneto et al., 2007).

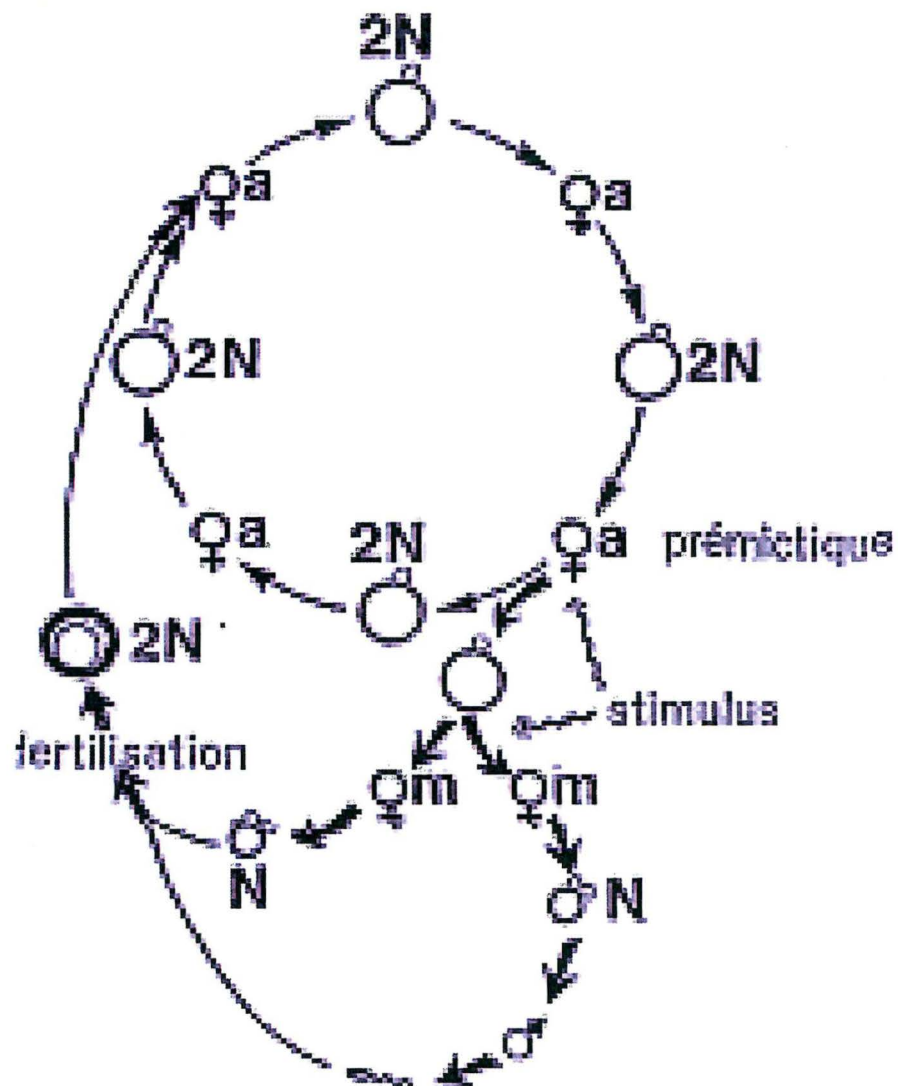


Fig. 2. Cycle de reproduction des rotifères Monogonontes (♀a = femelle amictique, ♀m = femelle mictique). (d'après Roger Pourriot, Rotifères 6. http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_texte_6/1dt/00557.pdf).

4) Reproduction et cycle de vie

Les modes de reproduction chez les rotifères varient fortement entre les trois classes existantes. En effet, les Seisonides sont des sexués obligatoires, les Bdelloïdes se reproduisent obligatoirement par parthénogénèse et les Monogonontes se reproduisent suivant une parthénogénèse cyclique. Ces derniers vivent dans des milieux aquatiques qui leur sont favorables de manière saisonnière : la parthénogénèse cyclique implique la création de multiples générations par reproduction asexuée ponctuée par des reproductions sexuées impliquant la création de mâles (Serra et al., 2004). On parle d'alternance entre un cycle amictique et un cycle mictique (**Fig. 2**). La reproduction sexuée est induite lorsque les conditions environnementales sont défavorables à cause de facteurs comme la densité de population. Lors d'une phase prémictique, des femelles asexuées produisent alors des organismes filles asexués et sexués par parthénogénèse. Les femelles capables de se reproduire de manière sexuée produisent des œufs haploïdes qui donnent soit naissance à des mâles haploïdes, soit à des œufs haploïdes qui deviennent diploïdes s'ils sont inséminés rapidement par les mâles haploïdes. Les œufs diploïdes sont capables d'entrer en dormance et éclosent lorsque les conditions sont favorables.

Les Bdelloïdes se reproduisent exclusivement de manière asexuée par parthénogénèse thélytoque apomictique (Ricci et al., 2000). Nous évoquerons plus loin l'impact évolutif d'un tel mode de reproduction. D'autre part, l'ensemble des rotifères sont eutéliques, ce qui veut dire que l'embryon généré est constitué d'un nombre fini de cellules et que la croissance se fait par grossissement des cellules. En outre, le nombre d'oocytes est fixé dès la naissance (Pagani et al., 1993). Notons que les Bdelloïdes nouveaux nés possèdent déjà leur mastax définitif et que les trophi ne changent pas de taille au cours de leur vie (Boschetti et al., 2005).

La durée de vie des Bdelloïdes est variable : celle-ci semble comprise entre 17 jours (*Adineta vaga*) et 76 jours (*Macrotachela insolita*) (Ricci, 1983). Des études montrent que l'histoire de vie des Bdelloïdes diffère entre les espèces vivant plutôt en milieu aquatique et les espèces vivant plutôt en milieu terrestre (Ricci, 1983 ; Ricci et Fascio, 1995). Les rotifères inféodés à des milieux aquatiques pondent davantage d'œufs de petite taille, tandis que les rotifères inféodés à des milieux plutôt terrestres pondent de gros œufs en plus faible quantité (Ricci et Fascio, 1995). La taille des œufs pourrait donc dépendre des pressions sélectives exercées en fonction du type de milieu.

II. Evolution des Bdelloïdes

1) Les avantages de la sexualité

La reproduction représente le processus par lequel les êtres vivants transmettent leurs gènes en donnant naissance à une autre génération d'êtres vivants. On distingue deux modes de reproduction : la reproduction asexuée qui implique la génération par un individu unique de descendants qui lui sont génétiquement identiques, et la reproduction sexuée qui implique une transmission par deux parents d'une combinaison unique de gènes à leurs descendants (Campbell et Reece, 2004).

A priori, la reproduction asexuée semble plus avantageuse que la reproduction sexuée : en supposant qu'une femelle asexuée soit capable de produire le même nombre de descendants qu'une femelle sexuée et en supposant que le fitness des descendants soit indépendant du mode de reproduction, une femelle asexuée produit potentiellement deux fois plus de descendants qu'une femelle sexuée (Serra et al., 2003 ; West et al., 1999). C'est ce que l'on qualifie en anglais de « two fold cost of sex », une théorie émise par l'éminent chercheur John Maynard Smith (1998). Par ailleurs, la sexualité comporte des coûts pour l'organisme : coût de la production des mâles, coût de la recherche du partenaire et coût du cycle sexuel (Serra et al., 2003). Outre l'importance des coûts liés à la sexualité, les phénomènes de recombinaisons génétiques peuvent modifier des combinaisons de gènes favorables dont la fréquence a augmenté sous la pression de la sélection naturelle (West et al., 1999). Malgré ces désavantages apparents, la reproduction sexuée est largement étendue à travers le règne animal et nombreuses sont les théories développées dans le but d'expliquer les avantages de la sexualité. On distingue en général deux grands types de théories : les théories environnementales et les théories basées sur le rôle des mutations (West et al., 1999).

Les modèles environnementaux suggèrent que la sexualité accélère les adaptations en créant de nouvelles combinaisons de gènes. Les pressions de sélection impliqueraient à la fois des mécanismes abiotiques et des mécanismes biotiques (West et al., 1999). Ces derniers comprennent par exemple les interactions hôte-parasite sur lesquelles nous reviendrons plus longuement par la suite.

Les modèles basés sur le phénomène de mutation suggèrent quant à eux que la reproduction sexuée est avantageuse car elle permettrait aux individus d'éliminer plus efficacement des mutations délétères via les recombinaisons génétiques. Ces dernières permettrait également de limiter l'importance des éléments génétiques parasites, tels que les transposons et les rétrotransposons, pouvant à terme induire l'extinction de leur hôte (Gladyshev et al., 2007 ; Arkhipova et Meselson, 2004). L'accumulation d'éléments transposables délétères est d'ailleurs considérée comme un facteur clé contribuant à l'extinction rapide des organismes asexués. En outre, la sexualité permet le partage de nouvelles combinaisons de gènes et de nouvelles mutations entre individus appartenant à une même espèce de telle sorte que les individus appartenant à une espèce restent similaires au cours du temps. Cependant, l'intervention de barrières physiques entre sous-groupes d'individus appartenant à la même espèce permet à ceux-ci d'évoluer selon des chemins différents (Hillis, 2007). Ce phénomène appelé spéciation constitue une source importante de diversité.

Les barrières physiques ne constituent pas la seule source de spéciation. La reproduction sexuée implique en effet bien souvent l'existence d'une sélection sexuelle, c'est-à-dire le choix des partenaires par la femelle ou la compétition entre les mâles pour une femelle. Cette dernière assure une sélection de « bons » gènes parentaux, optimisant ainsi le fitness des descendants (Serra et al., 2003) et constituerait également une force de spéciation (Panhuis et al., 2001). En outre, les coûts liés à la sexualité sont souvent réduits par la participation des mâles dans les soins parentaux (Serra et al., 2003).

La synergie de tous ces modèles pourrait expliquer pourquoi la reproduction sexuée comporte plus d'avantages sur le long terme d'un point de vue évolutif que la reproduction asexuée. En créant davantage de diversité et en purgeant les mutations délétères générées par le phénomène du cliquet de Müller, la sexualité faciliterait l'évolution rapide des organismes soumis à différents types de stress tels que l'exposition à un prédateur ou à un parasite (Serra et al., 2003).

2) L'évolution des Bdelloïdes

a. Les Bdelloïdes, scandales de l'évolution

Les lignées asexuées sont généralement considérées comme ayant une courte existence durant l'évolution, conséquence d'un temps d'adaptation trop court et d'une accumulation

importante de mutations délétères. Il existe cependant deux taxa anciens exclusivement asexués et riches en espèces : les ostracodes de la famille des Darwinulidae et la classe des Bdelloïdes (Butlin, 2002). Les Bdelloïdes constituent dès lors des organismes modèles uniques en biologie évolutive et forment une classe qui comprend quatre familles (Adinetidae, Habrotrochidae, Philodinae et Philodinidae), 19 genres et environ 460 espèces décrites (Segers, 2007). Depuis leur première description par Leeuwenhoek, il y a 300 ans, de nombreuses études ont été réalisées et aucune n'a pu montrer l'existence de mâles ou d'individus hermaphrodites chez les Bdelloïdes. Cette classe ne comprend donc que des femelles qui se reproduisent par apomixie, phénomène au cours duquel des œufs diploïdes sont produits par division mitotique et se développent parthénogénétiquement en femelles. Le groupe le plus proche des Bdelloïdes est celui des Monogonontes qui se reproduisent, comme nous l'avons vu plus haut, essentiellement par parthénogenèse apomictique avec occasionnellement une génération de reproduction sexuée.

Des fossiles montrent que les Bdelloïdes sont âgés d'au moins 35-40 millions d'années (Birky, 2004 ; Milius, 2000). Cependant, la diversité des séquences génétiques suggère que cette classe de rotifères serait en réalité âgée d'environ 100 millions d'années (Butlin, 2002), ce qui démontre un succès évolutif important de la part de ces invertébrés qui ne se reproduisent que par voie asexuée. Le succès des Bdelloïdes contredit donc certaines théories d'évolution et de génétique des populations selon lesquelles les organismes asexués ne peuvent se diversifier et ont une très courte durée de vie évolutive. C'est pour cette raison que les Bdelloïdes ont été qualifiés de « ancient asexual scandal » par Maynard Smith dans les années 70 (Birky, 2004 ; Butlin, 2002).

b. Asexualité des Bdelloïdes et tétraploïdie

On a estimé pendant longtemps que la méthode Meselson consistant à analyser la divergence de séquences génétiques confirmait l'absence de sexe chez les Bdelloïdes (Judson et al., 1996). On considérait jusqu'il y a peu qu'il résultait, en l'absence de recombinaison chez les Bdelloïdes, une accumulation de mutations au cours du temps dans les deux allèles d'un gène, ce qui aurait eu pour conséquence l'apparition d'une divergence indépendante et progressive des séquences de ces allèles. Cette hypothèse était notamment soutenue par l'hétéromorphisme des chromosomes de plusieurs espèces (Mark Welch et Meselson, 1998),

ainsi que par la présence chez *Philodina roseola* de quatre copies de séquences très différentes du gène *hsp82*, chacune située sur un chromosome différent (Mark Welch et al., 2004). Cependant, de récentes études montrent que la divergence entre les copies serait plutôt la conséquence de la tétraploïdie dégénérée des Bdelloïdes (Mark Welch et al., 2008 ; Hur et al., 2008). En effet, l'analyse du génome des espèces *Philodina roseola* et *Adineta vaga* révèle que celles-ci sont tétraploïdes dégénérées (Mark Welch et al., 2008 ; Hur et al., 2008 ; Van Doninck et al., in press). Cette tétraploïdie dégénérée, probablement apparue avant la radiation des Bdelloïdes suite à une duplication du génome, implique, d'une part, l'existence de deux paires de chromosomes colinéaires, chacune caractérisée par un petit nombre de gènes communs, et implique, d'autre part, le stockage de copies supplémentaires de nombreux gènes sur quatre chromosomes (Hur et al., 2008). Cette tétraploïdie permettrait la réparation de cassures générées dans le génome lors du processus de dessiccation. En effet, lorsque l'ADN est rompu suite à la dessiccation, des processus de réparation se mettraient en place lors de la réhydratation en utilisant des brins d'ADN présents en plusieurs copies comme patron (Mark Welch et al., 2008 ; Gladyshev et Meselson, 2008). Il est possible que le génome des Bdelloïdes subisse un remodelage important lors de la mise en place de ces mécanismes de réparation, ce qui pourrait contribuer à leur évolution.

c. La notion d'espèces chez les asexués

La reproduction sexuée a longtemps été vue comme le facteur majeur expliquant l'existence d'espèces et leur diversité. L'espèce est l'unité, ou taxon, de base en systématique et comporte plusieurs définitions selon la discipline étudiée. La notion d'espèce biologique s'avère dépourvue de sens dans le cas des asexués puisque l'on définit l'espèce biologique comme un groupe d'êtres vivants pouvant se reproduire entre eux (interfécondité) et dont la descendance est fertile. Malgré l'absence d'interfécondité chez les Bdelloïdes, de récentes analyses génétiques montrent l'existence de clusters génétiques bien séparés indiquant une évolution indépendante au sein du genre *Rotaria* et pouvant être considérés comme des espèces évolutives distinctes (Fontaneto et al., 2007). Une espèce évolutive représente un ensemble de populations qui partagent un destin évolutif. En outre, des analyses géniques couplées à une analyse morphologique des trophi ont montré l'existence d'une divergence génétique et morphologique probablement liée à une spéciation à des niches différentes, ce qui montre que l'isolation et la sélection peuvent, comme chez les sexués, être des sources de spéciation chez

les asexués. L'existence d'une véritable signification de l'espèce demeure actuellement sujette à de nombreux débats faisant intervenir biologie, épistémologie et sémantique.

d. Les transferts horizontaux de gènes chez les Bdelloïdes

Les transferts horizontaux de gènes sont quasi inexistantes chez les métazoaires. Le cas le plus connu est sans doute celui qui implique le genre bactérien *Agrobacterium* capable de transférer de l'ADN bactérien à des cellules somatiques végétales (Brown, 2003). Plus récemment, une équipe américaine a mis en évidence la présence de fragments génomiques du genre bactérien endosymbiotique *Wolbachia* dans le génome de divers arthropodes (Hottop et al., 2007). Ces rares transferts de gènes sont généralement associés à des cas d'endosymbioses ou de parasitisme.

Les transferts horizontaux semblent également exister chez les Bdelloïdes. Des analyses génétiques ont récemment montré que les régions télomériques des chromosomes d'*Adineta vaga* comprennent de nombreux gènes d'origine bactérienne, fongique ou encore végétale (Gladyshev et al., 2008). Bien que certains de ces gènes étrangers soient défectifs, d'autres par contre sont intacts et transcrits. La capture et l'assimilation de gènes exogènes pourrait donc représenter une force importante dans l'évolution des Bdelloïdes.

3) Conséquences évolutives de l'asexualité des Bdelloïdes

De l'asexualité des Bdelloïdes découlent deux conséquences évolutives essentielles : l'apparition de l'effet Meselson et la perte d'éléments transposables (Butlin, 2002).

Premièrement, l'absence de recombinaison entraîne une accumulation de mutations neutres au niveau des allèles. Dès lors, les allèles divergent progressivement et évoluent de manière indépendante pour un locus donné : c'est ce que l'on appelle l'effet Meselson (Butlin, 2002 ; Birky, 2004 ; Pouchkina-Stantcheva et al., 2007). Cet effet a récemment été mis en évidence dans le cas des gènes *lea*, récemment découverts chez les Bdelloïdes et impliqués dans le phénomène de dessiccation que nous détaillerons plus loin. Dans le cas de ces gènes, l'effet Meselson aurait mené à la formation de deux séquences similaires mais distinctes, localisées sur des chromosomes différents et nommées respectivement *Ar-lea-1A* et *Ar-lea-1B* (Meselson et Mark Welch., 2007 ; Pouchkina-Stantcheva et al., 2007). Il semble que les

protéines codées par ces deux gènes remplissent des rôles complémentaires pour la survie des Bdelloïdes lors d'une dessiccation. L'une des protéines prévient l'agrégation de certaines enzymes sensibles à la dessiccation, tandis que l'autre protéine s'associe avec la bicouche phospholipidique de manière à maintenir l'intégrité membranaire. Néanmoins, ce résultat pourrait être la conséquence d'une tétraploïdie dégénérée plutôt que de l'effet Meselson si les deux paires *Ar-lea* font partie de paires colinéaires différentes du génome (Meselson et Mark Welch, 2007).

La deuxième conséquence de l'asexualité des Bdelloïdes est la perte d'éléments transposables. Chez les sexués, la multiplication de ces éléments génétiques « parasites » dans un génome peut rapidement être suivie par une transmission de ces derniers aux génomes d'autres individus (Butlin, 2002). Les éléments transposables peuvent également s'étendre au sein des asexués et mener à leur extinction. Mais chez les Bdelloïdes, on constate une absence de rétrotransposons LINE-like et *gypsy*-like, alors qu'on les retrouve chez un grand nombre d'espèces animales (Arkhipova et Meselson, 2004). On pense que cette absence de rétrotransposons chez les Bdelloïdes leur aurait permis d'échapper à l'extinction que subissent la plupart des asexués obligés.

4) Les Bdelloïdes, véritables scandales évolutifs ?

Le grand âge et la diversité que présentent les anciens organismes asexués contredisent les théories qui stipulent que les organismes asexués sont caractérisés par un taux d'extinction plus important que les organismes sexués et par un taux de spéciation plus faible. Des travaux remettent d'ailleurs en cause l'asexualité exclusive des ostracodes de la famille des Darwinulidae (Smith et al., 2006). Quant aux Bdelloïdes, bien que leur asexualité exclusive ne soit pas remise en question, on estime que leur succès évolutif serait surtout dû à l'existence de mécanismes moléculaires particuliers liés à leur capacité à entrer en anhydrobiose.

III. La dormance chez les rotifères bdelloïdes

1) La dormance dans le règne animal

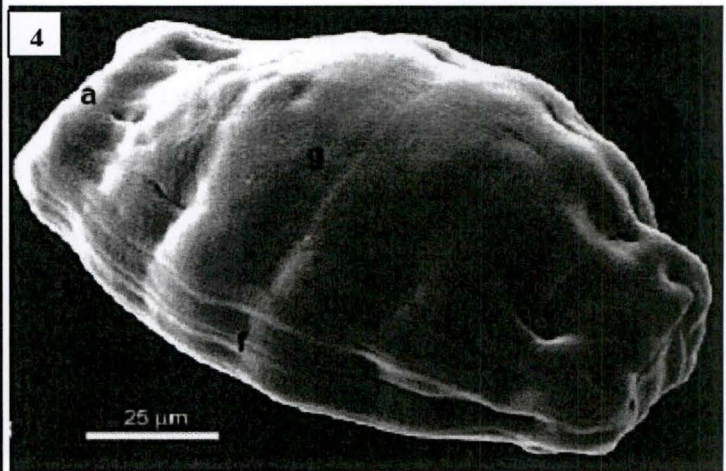
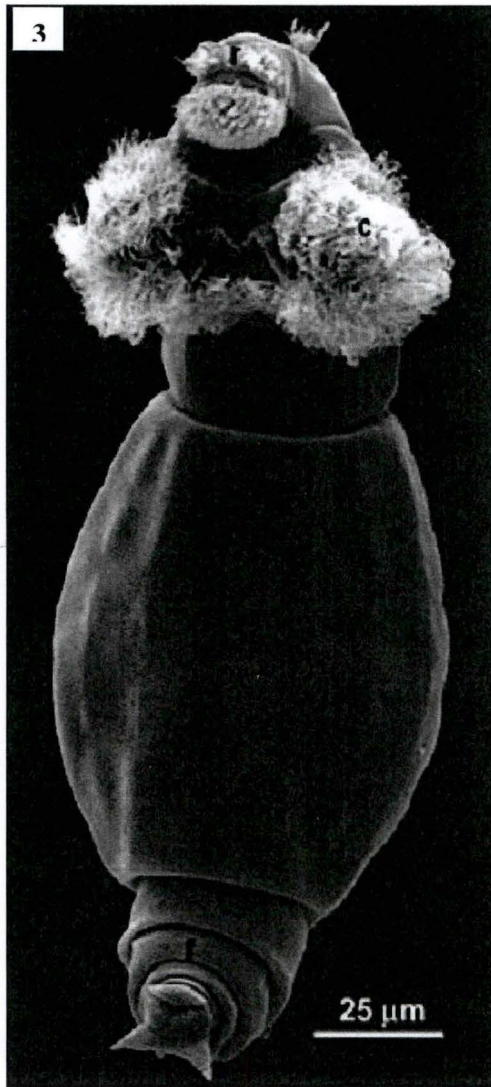
De nombreux organismes vivent dans des habitats éphémères et, lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à leur survie, soit ils quittent l'habitat, soit ils

restent dans celui-ci et rentrent éventuellement dans un processus appelé communément dormance. Cet état est caractérisé par une réduction de l'activité métabolique ainsi que par un arrêt du développement et constitue une résistance à un stress environnemental comme la sécheresse ou des températures extrêmes (Ricci, 2001).

Le terme « dormance » englobe en même temps les phénomènes de diapause et de quiescence. La diapause est initiée en réponse à divers stimuli (température, photopériode, densité de population...) qui correspondent à une détérioration environnementale pour l'organisme. Cet état est sous contrôle endogène et peut se maintenir au-delà de la période de stress. En outre, la diapause se caractérise par la production de formes dormantes spécifiques comme des œufs ou des larves : nombreuses sont les espèces d'insectes qui peuvent produire des larves capables de résister aux conditions environnementales défavorables. La quiescence se réfère, quant à elle, à des états comme l'hibernation, l'estivation ou les diverses formes de cryptobiose. Les animaux capables de rentrer dans un tel état peuvent y rentrer à n'importe quel moment de leur vie et s'y maintenir jusqu'à ce que des conditions plus favorables se manifestent (Ricci, 2001). Contrairement à la diapause, l'animal peut rentrer en quiescence à n'importe quel âge, sans qu'il soit nécessaire de produire des formes dormantes spécifiques. En outre, le contrôle est dans ce cas exogène puisqu'il est directement induit par une variété de stress environnementaux tels que l'augmentation ou la diminution de la température, la dessiccation, d'importantes concentrations en sels et le manque d'O₂ (Rebecchi et al., 2007).

Certains organismes sont capables de réduire leur activité métabolique à un niveau indétectable. Cette forme de quiescence est appelée cryptobiose et est définie comme l'état d'un organisme lorsqu'il ne montre pas de signe de vie et quand son activité métabolique devient difficilement mesurable (Rebecchi et al., 2007). La cryptobiose englobe différentes stratégies de résistance à divers stress telles que la cryobiose, l'osmobiose et l'anhydrobiose. Cette dernière stratégie est la forme de cryptobiose la mieux étudiée et est induite par la dessiccation, c'est-à-dire un état d'extrême sécheresse.

Un petit nombre d'organismes connus à ce jour sont capables de tolérer la dessiccation : diverses espèces de nématodes, les Bdelloïdes et les tardigrades possèdent cette faculté. Néanmoins, la tolérance à la dessiccation se manifeste également chez certaines espèces bactériennes, de mousses, d'angiospermes, de gymnospermes, d'arthropodes et même d'algues (Alpert, 2006). Dans le monde animal, les nématodes, les rotifères bdelloïdes et les tardigrades constituent des modèles dans l'étude relative aux résistances mises en place pour



Figs. 3-4. Fig. 3. *Macrotrachela quadricornifera*. MEB. Vue ventrale d'une forme hydratée. Fig. 4. *Macrotrachela quadricornifera*. MEB. Vue dorso-latérale d'une forme dessiquée (forme en tonneau). (D'après Ricci et al., 2007).

lutter contre la dessiccation. Les tardigrades sont par exemple capables de coloniser des milieux extrêmes comme les déserts ou les milieux polaires en contractant leur corps après une perte de 95% de l'eau corporelle, en synthétisant des molécules conférant une protection aux cellules (soit du tréhalose et/ou du glycérol et des *heat shock proteins*) et en réduisant leur activité métabolique (Bertolani et al., 2004). En outre, il a été montré dans le cas des tardigrades que l'agrégation pourrait être un important facteur de survie lors de périodes de dessiccation (Ivarsson et Jonsson, 2004).

2) La dormance chez les Bdelloïdes

a. *Les rotifères et la dormance*

Les sédiments des milieux lenticules et lotiques, les fins films d'eau qui entourent les particules du sol ou encore les lichens et les mousses, constituent les habitats de nombreuses espèces de Bdelloïdes. Lorsque l'eau de ces milieux s'évapore, les Bdelloïdes vont manifester une série de modifications morphologiques et physiologiques leur permettant de rentrer en anhydrobiose (Ricci et al., 1987 ; Ricci et al., 2003 ; Ricci et al., 2004 ; Ricci et al., 2005 ; Ricci et Covino, 2005 ; Alpert, 2006 et Ricci et al., 2007). Les modifications morphologiques permettent aux Bdelloïdes de se replier sous une forme de tonneau (**Figs. 3 et 4**) qui permettrait un meilleur contrôle des pertes d'eau durant le processus de dessiccation (Ricci, 2001 ; Ricci et al., 2003 ; Ricci et al., 2007). Notons qu'une forme similaire est initiée par d'autres stress tels que le manque de nourriture (Ricci et Perletti, 2006).

Bien que le phénomène de dormance existe également dans la classe des Monogonontes, il diffère néanmoins des Bdelloïdes. Les adultes produisent en effet des œufs qui peuvent rester en dormance durant plusieurs dizaines d'années et éclore avec un pourcentage de 80%. (Ricci, 2001). Certains facteurs environnementaux peuvent provoquer chez cette classe de rotifères une interruption de la reproduction parthénogénique (cycle amictique) et initier un cycle mictique menant à la formation d'œufs sexuellement produits, capables d'entrer en dormance. Cette dormance est notamment maintenue par la synthèse de tréhalose, une molécule protectrice qui maintient durant la période de stress l'intégrité des œufs de Monogonontes en remplaçant l'eau présente à l'intérieur de ces derniers et en stabilisant la structure des macromolécules et de la membrane des cellules (Caprioli et al., 2004). Cependant, contrairement aux Bdelloïdes qui vivent dans des environnements fréquemment exposés à la

dessiccation et ce, de manière imprévisible, les Monogonontes vivent dans des environnements dont les conditions fluctuent de manière cyclique (Ricci, 2001). La clé de cette adaptabilité chez les Bdelloïdes est la rapidité avec laquelle ils rentrent et sortent d'anhydrobiose à n'importe quel stade de leur vie.

b. Les mécanismes mis en place par les Bdelloïdes pour lutter contre la dessiccation

Bien que la plupart des espèces de Bdelloïdes soient capables d'entrer en anhydrobiose, la capacité des Bdelloïdes à rentrer dans cet état diffère selon les espèces et selon les habitats : les traits d'histoire de vie des différentes espèces semblent être affectés par la fréquence de dessiccation et diffèrent entre les espèces qui vivent dans les mousses et les espèces qui vivent dans des masses d'eaux (Ricci et Caprioli, 2005). Les espèces de milieux aquatiques permanents présentent une durée de vie plus faible mais une fécondité plus importante, contrairement aux espèces vivant dans les mousses, qui arrivent à maturité plus rapidement.

Contrairement aux Monogonontes, les Bdelloïdes ne synthétisent pas de tréhalose, un disaccharide produit par de nombreux organismes pour survivre en anhydrobiose en contribuant à la protection des constituants cellulaires (Caprioli et al., 2004 ; Lapinski et Tunnacliffe, 2003 ; Ricci et Caprioli, 2005). Il a cependant été prouvé récemment que les Bdelloïdes synthétisaient des protéines permettant de lutter contre la déshydratation. On a trouvé chez l'espèce *Adineta ricciae* deux séquences similaires mais distinctes et situées sur deux chromosomes différents codant pour de protéines LEA (Pouchkina-Stantcheva, et al. 2007). Il est fort probable que ces gènes furent des allèles qui ont progressivement divergé de manière à coder pour deux protéines différentes aux activités complémentaires ou deux copies qui ont divergé suite à une ancienne duplication génomique. Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'une des protéines prévient la dessiccation en empêchant certaines enzymes de s'agréger en période de sécheresse. L'autre protéine s'associe aux phospholipides de manière à maintenir l'intégrité membranaire.

Plus récemment encore, des chercheurs ont démontré que les Bdelloïdes étaient très résistants aux radiations ionisantes, contrairement aux Monogonontes (Gladyshev et Meselson, 2008). Il semblerait que cette résistance à des radiations ionisantes soit la conséquence de leur faculté à survivre à des épisodes de dessiccation au cours desquelles de

nombreuses cassures au sein de leur génome sont générées et réparées lors de la réhydratation. A ce jour, ces phénomènes de cassures et de réassemblage des fragments en un génome fonctionnel suite à la dessiccation ont surtout été étudiés sur la bactérie extrémophile *Deinococcus radiodurans* (Zahradka et al., 2006). La réparation des cassures double brin générées lors de la dessiccation nécessite l'existence d'un brin homologue jouant le rôle de patron (Gladyshev et Meselson, 2008), ce qui semble apporté par la probable tétraploïdie des Bdelloïdes évoquée plus haut (Mark Welch et al., 2008 ; Hur et al., 2008).

Outre les modifications biochimiques et génomiques, qui actuellement sont encore peu connues, les modifications morphologiques permettent aux Bdelloïdes d'adopter une forme leur permettant de faire face à la dessiccation (Ricci et al., 2003 ; Ricci et al., 2007). Leur taille se réduit, ils peuvent perdre 60% de leur eau et voir leur poids se réduire de 95%. Les modifications cytosquelettiques permettent aux individus d'adopter une forme en tonneau qui préserve les structures internes indispensables au bon déroulement de l'anhydrobiose.

c. L'impact de l'anhydrobiose sur le fitness

Quelques études montrent que la dessiccation permettrait d'augmenter le fitness de certaines espèces de Bdelloïdes. En effet, après dessiccation, l'espèce *Adineta ricciae* produit significativement plus d'œufs que les contrôles hydratés (Ricci et Caprioli, 2005). L'entrée en anhydrobiose pourrait stimuler des processus physiologiques conférant aux Bdelloïdes un avantage après la dormance. Les mécanismes sous-jacents sont inconnus à ce jour.

D'autres études postulent que la dessiccation permet aux Bdelloïdes d'éviter un déclin rapide du fitness. Néanmoins, encore une fois, il est difficile d'expliquer cette constatation. La dessiccation permettrait peut-être la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN capables de restaurer l'intégrité et la fonction de la molécule qui accumule les mutations délétères à la suite d'une reproduction parthénogénétique continue. Il est possible que ces mécanismes de réparation soient mis en place lors du réassemblage du génome, après réhydratation. La dessiccation pourrait également contribuer à la création rapide de variations génétiques (Van Doninck, communication personnelle), un élément essentiel en évolution. Il paraît indéniable que le mode de vie anhydrobiotique des Bdelloïdes a contribué à leur succès évolutif, en partie parce que leur faculté à rentrer en anhydrobiose leur permettrait d'échapper à des compétiteurs, des prédateurs et des parasites, sensibles eux à la dessiccation (Gladyshev et Meselson, 2008 ; Ricci et Caprioli, 2005).

IV. Le parasitisme chez les Bdelloïdes

1) Les interactions microbiennes

Les microorganismes peuvent s'associer à divers organismes de multiples façons (Prescott et al., 2003). Ces interactions biologiques peuvent être positives (mutualisme, protocoopération et commensalisme) ou négatives (prédation, parasitisme, amensalisme et compétition). La prédation et le parasitisme constituent deux types d'interaction biologique impliquant tous deux un effet négatif sur l'un des organismes. La prédation implique la capture de proies par un organisme pour se nourrir, et, bien qu'il constitue un phénomène répandu parmi les microorganismes, le parasitisme est probablement l'une des interactions microbiennes les plus complexes et les plus intéressantes. Cette interaction biologique implique un organisme (le parasite) qui vit aux dépens d'un hôte (Campbell et Reece, 2004). Le bénéfice de la relation est unilatéral et le parasite est destructeur pour son propre hôte. Le parasitisme est considéré comme un cas particulier de prédation : le parasite se nourrit aux dépens de son hôte, sans intention de le tuer, provoquant une diminution du fitness de ce dernier. Par conséquent, on peut définir les parasites comme tout organisme vivant en association étroite avec un organisme hôte pour lequel l'association a un coût qui peut se traduire par une réduction de la fécondité et/ou de la survie (Ebert, 2005). Cette définition inclut les virus, les bactéries, les mycètes, les protozoaires et les helminthes.

Les relations parasitaires sont très répandues au sein du monde vivant et, comme nous le verrons plus loin, elles peuvent avoir une grande incidence sur l'écologie et l'évolution des espèces (Ebert, 2005). Les parasites peuvent avoir un impact sur le fitness de leur hôte et sur les traits d'histoire de vie de ce dernier. Par conséquent, les parasites peuvent exercer une influence sur la dynamique des populations hôtes, sur le maintien de la diversité génétique, sur la sélection sexuelle et sur le fitness. Avant d'évoquer des cas de parasitisme rencontrés chez les Bdelloïdes, nous allons décrire les conséquences majeures du parasitisme sur les hôtes en général.

2) Les conséquences du parasitisme sur l'hôte

a. Les premières défenses d'un hôte face à un parasite

Pour se défendre des parasites, les hôtes peuvent adopter diverses stratégies dont certaines vont avoir pour conséquence des modifications de la physiologie et du comportement de l'hôte. La première stratégie consiste à éviter la rencontre avec le parasite. Cette première ligne de défense fait appel à des modifications comportementales qui permettent à l'hôte de compenser les effets du parasite. On distingue les adaptations comportementales éco-épidémiologiques et les adaptations comportementales évolutives (Jog et Watve, 2005). Les premières comprennent les comportements qui permettent d'éviter le contact entre l'hôte et le parasite ou qui permettent d'éliminer le parasite. L'automédication que pratiquent certains animaux en se nourrissant préférentiellement de certains types de végétaux pour se débarrasser de parasites constitue un exemple d'adaptation éco-épidémiologique (Poulin, 1995 ; Jog et Watve, 2005). Les adaptations évolutives concernent quant à elles surtout les adaptations liées à la reproduction sexuées. Le parasitisme s'avère en effet être une force sélective potentielle dans l'évolution des systèmes de reproduction et des comportements liés au choix de partenaires chez les hôtes.

S'il y a rencontre entre l'hôte et le parasite, l'hôte peut utiliser des barrières physiques (telle la présence d'une cuticule chitineuse chez les insectes) pour limiter un contact trop rapproché. Lorsqu'il y a contact, l'hôte peut également empêcher la croissance du parasite en développant par exemple un système immunitaire plus ou moins sophistiqué (Carton et al., 2005). La machinerie complexe que constitue le système immunitaire comporte souvent des coûts énergétiques de maintien et de fonctionnement qui entraînent des modifications des traits d'histoire de vie (Thomas et al., 2007).

b. L'impact du parasitisme sur les traits d'histoire de vie et sur le fitness de l'hôte

Les parasites peuvent affecter la croissance, la reproduction et la survie de leur hôte. La biologie évolutive prédit que les hôtes infectés vont généralement avoir tendance à allouer préférentiellement leurs ressources à la reproduction au dépend de leur croissance et de leur survie (Agnew et al., 2000). La fécondité de l'hôte et sa survie sont les deux composantes

relatives au fitness, mesures de la capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire, souvent prises en considération dans les études relatives au parasitisme (Ebert, 2005).

Traits d'histoire de vie et fitness sont intimement liés et une façon pour l'hôte de se défendre contre le parasite, sans pour autant s'opposer à ce dernier, consiste à modifier ses traits d'histoire de vie de manière à réduire le coût du fitness lié au parasitisme. Ces modifications peuvent être regroupées en deux catégories (Thomas et al., 2007). Il peut s'agir de réponses plastiques individuelles : dans ce cas, les individus exposés au parasite modifient très rapidement leurs traits d'histoire de vie afin de compenser la réduction de leur valeur sélective. Des études montrent par exemple que des clones de l'espèce *Daphnia magna*, s'ils sont infectés tôt dans leur vie par la bactérie castratrice *Pasteuria ramosa*, peuvent manifester une maturation plus rapide ayant pour effet de réduire l'âge de la première reproduction (Ebert, 2005). Des expériences similaires réalisées avec la microsporidie *Glucoides intestinalis* montrent des résultats semblables (Chadwick et Little, 2004). Cette allocation d'énergie à la reproduction permet aux cladocères parasités de compenser les effets de la future castration. La seconde catégorie de modifications des traits d'histoire de vie en réponse aux contraintes parasitaires concerne les réponses évolutives populationnelles. Ces dernières s'expriment même en l'absence du parasite et les individus ajustent leurs traits d'histoire de vie de manière à compenser les effets d'une future infestation. Ce type de réponse est une compensation par anticipation et est sélectionnée lorsque le risque d'être infecté est grand. Par exemple, les mollusques du genre *Cerithidea* atteignent la maturité sexuelle plus tôt dans les lagunes où le risque de castration par des trématodes est élevé (Thomas et al., 2007).

Dans la plupart des cas, le coût du parasitisme augmente à mesure que l'infection progresse et les effets pathologiques tels que la détérioration de tissus augmentent également (Thomas et al, 2007). De plus, la croissance du parasite à l'intérieur de son hôte est souvent exponentielle, ce qui induit une augmentation des coûts pour l'hôte : le coût du parasitisme augmente donc avec le temps.

Les études relatives à l'impact du parasitisme sur le fitness de l'hôte demeurent complexes car de multiples facteurs interviennent. Différentes études avec le genre *Daphnia* pour hôte modèle montrent que le coût du parasitisme pour l'hôte dépend à la fois de l'espèce parasite et des conditions environnementales (Ebert, 2005). Les dommages causés à l'hôte varient en fonction de l'espèce hôte et de l'espèce parasite, de leur génotype et des interactions entre les

deux partenaires. Mais, des facteurs environnementaux tels que la température et les conditions nutritives semblent aussi jouer un rôle capital sur le fitness : des individus de l'espèce *Daphnia magna* maintenus dans un milieu riche en nourriture et confrontés à la bactérie *Pasteuria ramosa* produisent par exemple davantage d'œufs que les individus maintenus dans un milieu contenant peu de nourriture (Ebert, 2005).

c. Parasitisme et régulation des populations hôtes

On connaît peu de choses concernant les effets des parasites sur l'écologie des communautés, mais il est certain que les parasites ont un impact sur la dynamique des populations hôtes. Diverses expériences avec des espèces de daphnies comme hôtes modèles montrent que les parasites réduisent la densité d'hôtes et la survie des populations (Ebert, 2005). Par exemple, de nombreuses espèces de chytrides parasites pourraient constituer des régulateurs forts des populations de daphnies au sein des écosystèmes lacustres en augmentant la mortalité et en diminuant la fertilité de ces cladocères (Johnson et al, 2006).

En outre, les facteurs abiotiques et les facteurs biotiques tels que la compétition intraspécifique par exemple, pourraient influencer ces relations hôtes-parasites en milieu aquatique (Ebert, 2005).

3) La théorie de la Reine Rouge

La théorie de la Reine Rouge est, en biologie évolutive, une hypothèse développée par le biologiste américain Leigh Van Valen en 1970 (Lively, 1996). Selon cette théorie, l'évolution des espèces est essentiellement le résultat des interactions entre les êtres vivants : une fois qu'une espèce s'adapte à un facteur, elle modifie l'environnement biotique pour les espèces qui l'entourent et qui sont donc contraintes à s'adapter. Cette théorie favorise ainsi les facteurs biotiques comme « sélectionneurs » de l'évolution. Cette hypothèse tire son nom du deuxième volet d'« Alice au pays des merveilles », *De l'autre côté du miroir* (Carroll, 1872). Dans ce livre, Alice découvre un jeu d'échec en traversant un miroir et fait la rencontre de la Reine Rouge. Les deux personnages vont se lancer dans une course effrénée où Alice demande : « Mais, Reine Rouge, c'est étrange, nous courons vite et le paysage autour de nous ne change pas ? » La reine répond : « Nous courons pour rester à la même place ». Cette

métaphore symbolise la course à l'armement entre les espèces. Dans un système hôte-parasite, les deux espèces exercent l'une sur l'autre des pressions sélectives : à chaque fois que l'hôte s'adapte, le parasite est contraint de s'adapter. Les interactions antagonistes entre hôtes et parasites constituent donc une force conduisant à la coévolution dans les populations naturelles (Decaestecker et al., 2007). La théorie de la Reine Rouge permet notamment d'expliquer les avantages de la reproduction sexuée : dans cette course évolutive, la reproduction sexuée confère aux espèces un avantage puisqu'elle permet une constante recombinaison des allèles et donc une variation (Ebert et Hamilton, 1996 ; Lively, 1996). L'hôte sexué générant des descendants différents de lui, les parasites doivent trouver de nouvelles stratégies pour envahir ces nouveaux hôtes auxquels ils sont moins adaptés (Little et al., 2006).

4) Le parasitisme chez les rotifères Bdelloïdes

a. La reproduction sexuée, source de diversité génétique

La classe des Bdelloïdes est composée d'individus exclusivement asexués sur lesquels la théorie de la Reine Rouge ne semble pas avoir prise. Cependant, malgré l'existence de diverses études relatives à l'asexualité des Bdelloïdes et à leur évolution, il n'existe à ce jour que très peu d'informations concernant les interactions hôte-parasite impliquant cette classe de rotifères. Les quelques études réalisées à propos de parasites chez les Bdelloïdes sont essentiellement descriptives et centrées sur la diversité des parasites fongiques susceptibles d'infecter cette classe de rotifères (Barron, 1985 ; Barron et Szijarto, 1982 ; Barron et Szijarto, 1984 ; Barron et Szijarto, 1990 ; Barron et Szijarto, 1991 ; Barron et Tzean, 1981 ; Barron, 1980a ; Barron, 1980b ; Barron, 1981 ; Barron, 1983a ; Barron, 1983b ; Barron, 1986 ; Barron, 1989 ; Barron, 1990 ; Barron, 1991a ; Barron, 1991b, Barron, 1991c, Barron et al., 1990). Il existe cependant quelques études plus récentes, mais tout aussi descriptives, concernant les parasites fongiques de rotifères et nématodes (Glocking, 1998a ; Glocking, 1998b ; Glocking et Holbrook, 2003).

De rares études réalisées sous un angle épidémiologique montrent que certaines espèces de Monogonontes peuvent se voir infectées par des bactéries et des champignons microscopiques en milieu naturel durant certaines périodes de l'année (Gorbunov et al., 2001). Il semble également exister des protozoaires parasites capables d'infecter certaines espèces de

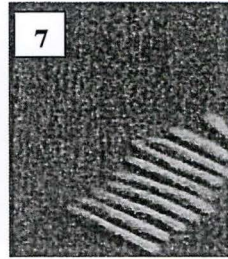
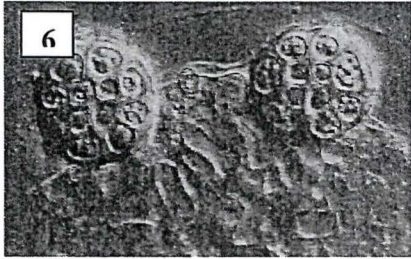
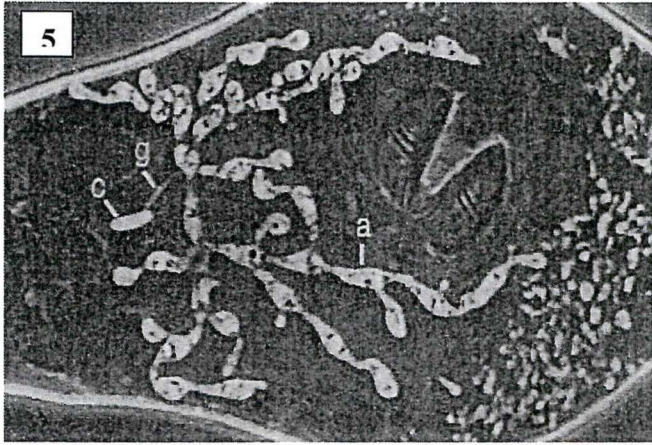
Monogonontes. Une étude rapporte même des cas d'infection virale chez l'espèce *Brachionus plicatilis* par un birnavirus (Comps et Menu., 1997). En outre, on rapporte l'existence de bactéries ectosymbiotiques Gram négatives logeant au niveau des cellules ciliées situées dans la région buccale chez une espèce de Monogonontes (Selmi., 2001).

b. Les parasites fongiques

Un nombre considérable d'espèces mycéliales obtiennent les nutriments dont elles ont besoin pour survivre en attaquant et consommant des invertébrés microscopiques vivants tels que les nématodes et les rotifères. Plusieurs centaines d'espèces appartenant aux embranchements des ascomycètes, des basidiomycètes, des chytridiomycètes et des zygomycètes ont été identifiées à ce jour et certaines d'entre elles peuvent infecter des rotifères. En outre, des parasites appartenant au règne des protistes (groupe des oomycètes) peuvent également infecter certaines espèces de nématodes et rotifères.

Les parasites et prédateurs fongiques de microfaune possèdent trois modes d'existence : prédation, parasitisme d'invertébrés adultes et parasitisme d'œufs ou kystes d'invertébrés (Mueller et al., 2004). Les espèces prédatrices sont capables de former de larges réseaux mycéliens qui leur permettent d'attraper des proies à l'aide d'extensions qui peuvent être contractiles. Dès que l'animal est capturé dans ce réseau, les extensions peuvent percer l'animal et germer pour former des hyphes capables de digérer le milieu interne. Les espèces qui adoptent ce mode de vie produisent généralement des conidies non-infectieuses au niveau du mycélium externe.

Les espèces parasites forment quant à elles un mycélium externe limité à leur hôte, mais sont capables de produire des conidies infectieuses ou des zoospores pouvant être ingérées par l'hôte ou capables d'adhérer à la surface de l'hôte. Les conidies infectieuses vont d'abord germer pour ensuite coloniser l'invertébré hôte en développant des hyphes digestifs à l'intérieur du corps du rotifère ou du nématode. Une fois que l'hôte est totalement colonisé et digéré, les hyphes vont réémerger pour produire d'autres conidies infectieuses. Le dernier groupe de mycètes sont les parasites d'œufs et de kystes qui peuvent également infecter leur hôte par l'intermédiaire de conidies infectieuses ou de zoospores.



Figs. 5-8. Fig. 5. Germination d'une conidie libérée par *Rotiferophthora cylindrospora*. X 1000. Fig. 6. Aleuriospores libérées par *Rotiferophthora angustispora*. X 1200. Fig. 7. Conidies libérées par *Rotiferophthora angustispora*. X 2000. Fig. 8. Conidiophores développés par *Rotiferophthora angustispora*. X 900. (D'après Barron, 1991).

c. *Le genre Rotiferophthora*

Actuellement, on connaît plus d'une soixantaine d'espèces de mycètes capables d'attaquer les Bdelloïdes, seuls types d'organismes connus à ce jour pour parasiter cette classe de rotifère. Le genre *Rotiferophthora* comporte des espèces exclusivement spécifiques aux Bdelloïdes, raison pour laquelle il a été utilisé dans les quelques tentatives d'études concernant les relations hôte-parasite chez les Bdelloïdes. Ce genre a été érigé par Barron en 1991 afin d'inclure les champignons parasites de rotifères appartenant auparavant au genre *Diheterospora* (Barron, 1991), ce dernier genre comprenant des espèces jugées différentes que l'on détermina alors comme appartenant au genre *Rotiferophthora* ou au genre *Verticillium*. Le genre *Rotiferophthora* comprend 24 espèces qui sont exclusivement endoparasites facultatifs de Bdelloïdes (Glocking, 1998a). C'est principalement chez les Bdelloïdes du genre *Adineta* que ce parasitisme a été décrit. Le genre *Rotiferophthora* appartient au phylum des ascomycètes, à la classe des Sordariomycetes et à l'ordre des Hypocreales. Les espèces appartenant à ce genre peuvent produire deux types de spores (Barron, 1985 ; Glocking, 1998a et Glocking, 1998b). On distingue d'abord les conidies (Fig. 7), les spores qui permettent une reproduction asexuée et qui sont produits par les conidiophores (Fig. 8). Ces conidies peuvent se loger au niveau du mastax pour germer et produire un fin tube germinatif donnant naissance à des hyphes qui colonisent rapidement l'ensemble du corps de l'hôte (Fig. 5). Après un certain temps, les hyphes traversent la cuticule du Bdelloïdes et donnent naissance à des conodiophores libérant eux-mêmes des conidies. Outre les conidies, on distingue également les aleuriospores, spores de persistance non infectieuses (Fig. 6).

V. Objectifs du présent travail

Dans ce travail, nous tenterons dans un premier temps d'évaluer l'impact à court terme du parasitisme induit par le champignon *Rotiferophthora angustispora* sur l'espèce de Bdelloïde *Adineta vaga* notamment en déterminant l'évolution au cours du temps du nombre d'individus actifs, du pourcentage d'organismes morts, du pourcentage d'individus stressés, du nombre d'œufs pondus par femme par jour d'observation ainsi que l'évolution du pourcentage d'individus infectés au cours du temps. L'évaluation de l'ensemble de ces paramètres

permettra de mieux comprendre l'impact que peut avoir le champignon parasite sur les traits d'histoire de vie d'une espèce de Bdelloïde ainsi que sur l'évolution de sa valeur sélective.

Parallèlement, nous tenterons d'évaluer les différences morphologiques entre des individus exposés à trois stress différents (parasitisme, absence de nourriture et dessiccation) en utilisant la microscopie électronique à balayage. Ces observations aideront à comprendre les mécanismes mis en place chez ces asexués anciens lorsqu'ils sont confrontés à différents types de stress.

2. MATERIEL ET METHODES

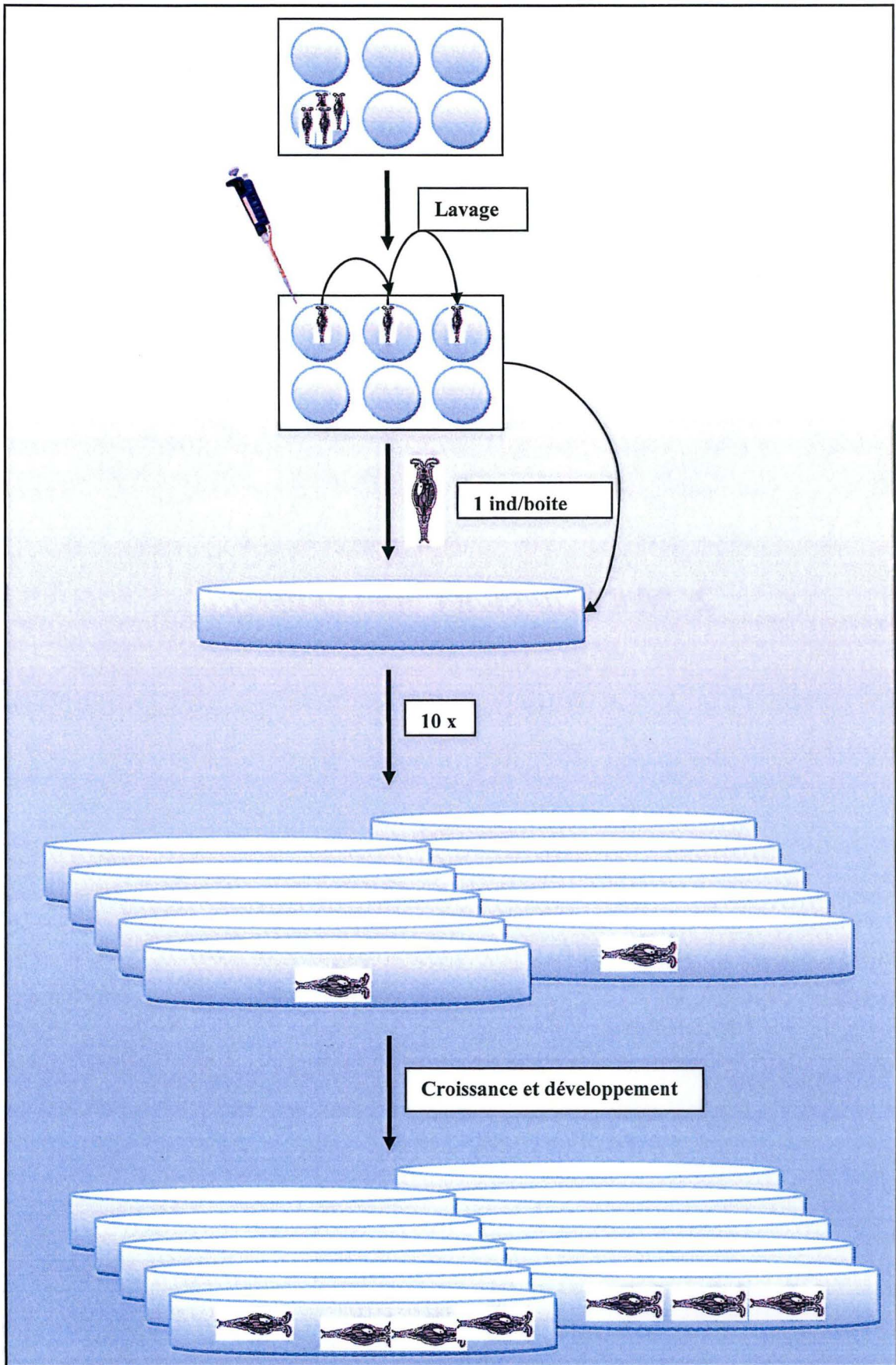


Fig. 9. Démarches réalisées pour obtenir plusieurs cultures de rotifères.

I. Matériel biologique et analyses génétiques

1) Les cultures de Bdelloïdes

Les cultures de Bdelloïdes destinées à l'ensemble des expériences ont été réalisées à partir d'une culture initiale composée d'individus appartenant à une espèce inconnue et isolée à partir d'échantillons de mousses récoltés dans la localité de Malonne (Belgique). Dans un premier temps, un individu prélevé de la culture initiale a été soumis à trois lavages dans de l'eau de Volvic préalablement filtrée (Fig. 9). Ce lavage est nécessaire pour éviter les risques de contamination par d'autres individus ou d'autres organismes susceptibles d'interférer avec le mode de vie des Bdelloïdes. Après l'étape de lavage, un seul individu est transféré dans une grande boîte de Petri contenant une épaisseur de 0,5 cm d'agar (Sigma) et une couche d'eau de Volvic préalablement filtrée d'environ 0,5 cm. L'eau de Volvic contient les éléments nécessaires au mode de vie des Bdelloïdes. Les étapes de lavage et de transfert ont été répétées 10 fois dans le but d'obtenir un stock de 10 grandes boîtes de Petri au sein desquelles l'individu initialement déposé se reproduit et donne naissance après 3 mois à une population composée de nombreux individus clones.

Au cours des trois mois d'incubation, les cultures ont régulièrement été inspectées afin de maintenir un niveau d'eau suffisant, de vérifier l'absence de contamination par d'autres organismes et de s'assurer d'une présence suffisante de nourriture. Les différentes cultures ont été placées dans un incubateur pour être maintenues à une température constante de 22°C. Au cours de cette période d'incubation, les organismes ont été nourris avec une solution de grains de millet dilués préalablement stérilisée.

Les analyses génétiques réalisées par la suite ont montré que les individus mis en culture appartenaient à l'espèce *Adineta vaga*. Cette dernière est caractérisée par une durée de vie moyenne de 17 jours (Ricci, 1983), ce qui en fait une des plus courtes parmi les différentes espèces de Bdelloïdes. L'intérêt principal de cette espèce réside essentiellement au fait qu'elle est très facile à maintenir en culture. Cette caractéristique essentielle fait d'*Adineta vaga* une espèce largement répandue au sein des laboratoires qui étudient les Bdelloïdes. Le mode de vie de cette espèce est par conséquent bien connu et en fait un organisme modèle idéal.

2) Les analyses génétiques

a. Choix du marqueur moléculaire

Dans le but d'identifier l'espèce récoltée à Malonne et mise en culture, et de vérifier la clonalité des individus au sein des différentes boîtes de cultures, le marqueur moléculaire COI (cytochrome *c* oxidase I) a été amplifié et séquencé. De récents travaux montrent en effet qu'une région de 648-kb du gène mitochondrial cytochrome *c* oxidase I (COI) est comparable à un code barre et permet d'identifier de nombreuses espèces animales (Hebert et al., 2004 et Robba et al., 2006). Ce gène code pour la première sous-unité de la *cytochrome C oxydase*, une enzyme impliquée dans le transport des électrons au niveau de la membrane mitochondriale. L'intérêt de l'ADN mitochondrial dans les études phylogénétiques réside dans son évolution plus rapide que l'ADN nucléaire, ce qui se traduit par une accumulation de différences entre espèces parentes proches.

Pour réaliser les analyses génétiques, les 5 boîtes de Petri qui présentaient le plus grand nombre d'individus ont été sélectionnées (**Fig. 10**). Les étapes d'extraction et d'amplification ont été effectuées sur 10 individus séparés pour chacune des boîtes de Petri. Le séquençage (coûteux) n'a quant à lui été réalisé que pour 16 échantillons pris au hasard au sein des 50 réalisés. Les séquences obtenues ont été alignées et comparées.

b. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée suivant la procédure utilisée par Gomez et Carvalho (2000). Cette méthode d'extraction est simple, rapide et peu coûteuse, notamment parce qu'elle n'implique pas l'utilisation de solvants organiques. Elle est basée sur la capacité du Chelex, résine polaire, à se lier aux composants cellulaires polaires après la rupture des cellules. L'ADN non polaire et l'ARN sont ainsi maintenus dans une phase hydrique formée au-dessus du Chelex. En outre, le Chelex a la propriété de chélater des cations comme le Ca^{2+} , le Mn^{2+} et le Mg^{2+} , qui peuvent provoquer des cassures dans l'ADN à de fortes températures. En chélatant les ions Mg^{2+} , indispensables à l'activité de nucléases, le Chelex inhibe l'activité de ces enzymes.

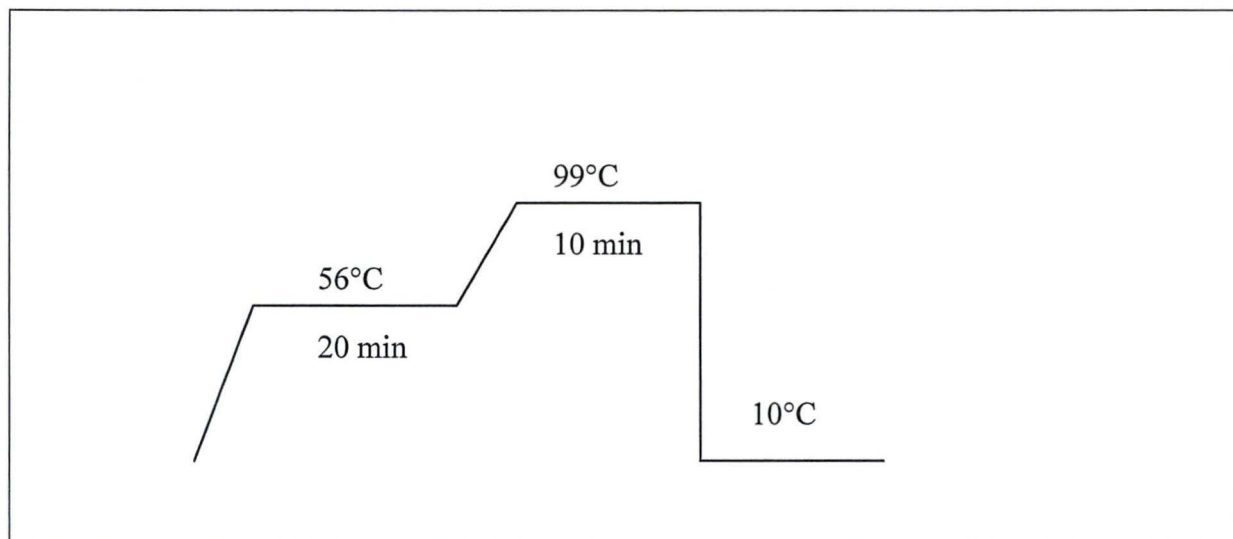


Fig. 11. Profil de températures pour l'extraction au Chelex.

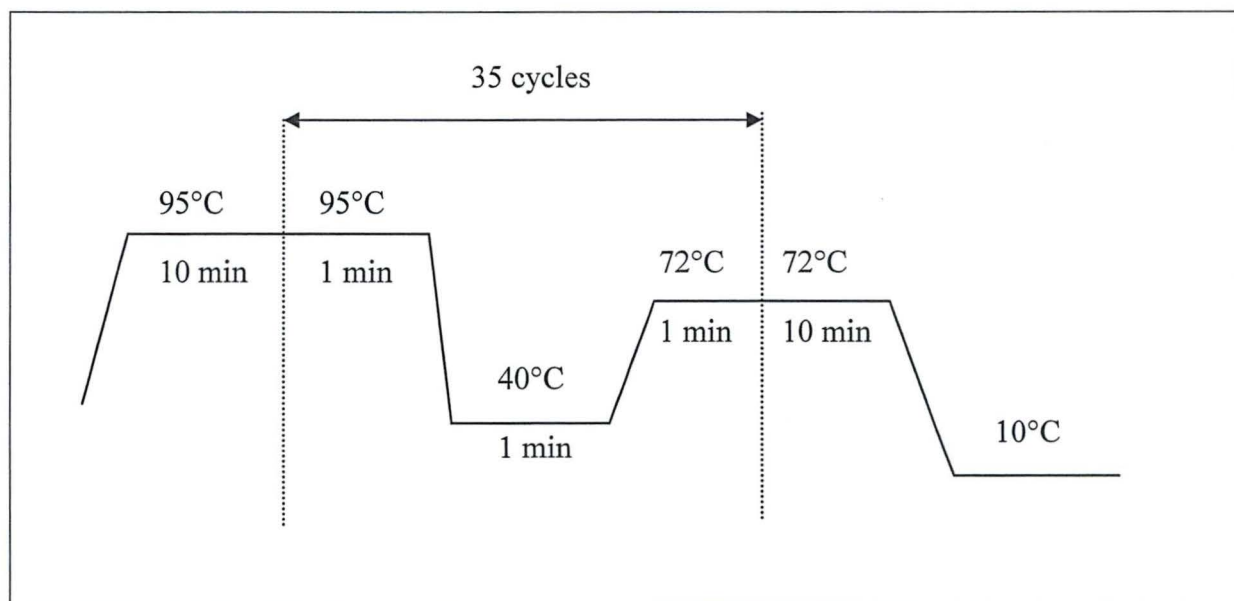


Fig. 12. Profil de température pour l'amplification de COI.

Avant l'extraction, les rotifères ont d'abord été rincés dans de l'eau de Volvic préalablement filtrée et par la suite transférés individuellement dans des tubes PCR de 0,2 ml. L'utilisation d'un stéréomicroscope a permis de vérifier la présence de chaque individu dans les tubes. 35 µl de chelex 100 6% (Bio-Rad) ont ensuite été placés dans chacun des tubes. Après un court passage au vortex, les tubes ont été incubés à 56°C durant 20 minutes et à 100°C durant 20 minutes en utilisant un thermocycleur Whatman Biometra TProfessional (**Fig. 11**). Après cette étape d'incubation, les échantillons ont été centrifugés et puis conservés au congélateur à -20°C.

c. Choix des amorces

La paire d'amorces suivante a été utilisée : l'amorce reverse 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA et l'amorce forward 5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG (Folmer et al., 1994).

d. Amplification du marqueur

L'amplification de la région cible du gène COI a été réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction). Le mélange, dissous dans de l'eau bidistillée, dont le volume final s'élève à 25 µl par échantillon, a été réalisé à partir de 0,4 µM de chacune des 2 amorces (Eurogentec), de 150 µM de dNTP (Promega) de 11,1 ml d'eau, de 5µl de tampon (Promega), de 1 unité de Taq polymérase (Promega) et de 3 µl de la solution d'ADN issue du surnageant obtenu après centrifugation du résultat de l'extraction. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur Whatman Biometra TProfessional. Le profil de température (**Fig. 12**) débute par une période de 5 minutes à 95°C suivie de 35 cycles comprenant chacun une étape de 1 minute à 95°C, une étape de 1 minute à 40°C et une étape de 1 minute à 72°C. Les 35 cycles sont suivis par une période de 10 minutes à 72°C. A la fin du processus, la température descend à 10°C jusqu'à réception des échantillons qui sont conservés à -20°C en attente du séquençage.

e. Electrophorèse sur gel d'agarose

Avant d'envoyer les échantillons au séquençage, un gel d'électrophorèse a été réalisé afin de vérifier le bon déroulement de l'amplification et l'absence de contamination. Les gels utilisés étaient de l'agarose 1% dans de la teinture SYBR Safe (Invitrogen), transférés dans une cuve remplie de tampon TAE 1%. Dans chaque puits ont été transférés 5 µl d'échantillons mélangés à 3 µl de bleu de bromophénol (Promega).

La migration a été réalisée durant 30 minutes selon un voltage de 120 volts et un courant de 500 mA. La révélation des gels a été réalisée aux UV.

f. Séquençage et alignement

Le séquençage des échantillons a été réalisé par la société MacroGen Inc. selon la méthode de Sanger en utilisant un analyseur ABI 3730xl. Les chromatogrammes obtenus ont été examinés avec le logiciel BioEdit. Dans un premier temps, un alignement multiple des séquences a été réalisé par ClustalW au sein même de BioEdit. Après un premier examen des chromatogrammes, deux séquences se sont révélées de mauvaise qualité et ont été retirées du lot. Un second alignement a été réalisé en l'absence des deux mauvaises séquences. Pour chaque différence de nucléotides, les chromatogrammes ont été comparés et nettoyés. Finalement, les séquences ont été blastées contre GenBank en utilisant blastn megablast.

II. Observations écologiques

1) Cultures

*a. Le champignon parasite *Rotiferophthora angustispora**

Comme décrit plus haut, le genre *Rotiferophthora* infecte spécifiquement les rotifères. L'espèce *Rotiferophthora angustispora* utilisée est originaire du Central Bureau voor Schimmelcultures Cat. No. 101437 (Amsterdam) et a été cultivée dans des plaques de 6 puits comprenant à chaque fois 6 ml de Corn Meal Agar (CMA) 25g/l. L'inoculation a été effectuée sous une hotte à flux laminaire pour éviter les contaminations des cultures par d'autres

microorganismes. L'inoculation terminée, les cultures ont été maintenues dans un incubateur à 22°C durant une période de 3 semaines. Après cette période, la taille des champignons avait atteint 2 cm de diamètre environ et ils pouvaient être utilisés pour les expériences concernant l'infection.

b. La nourriture

Bien que le grain de millet soit très pratique pour nourrir des cultures de Bdelloïdes, il s'avère particulièrement peu intéressant lorsque l'on désire réaliser des observations et du comptage. En effet, la substance a tendance à former des paquets « crasseux » empêchant une bonne observation au stéréomicroscope. C'est la raison pour laquelle les expériences relatives aux observations écologiques ont nécessité une nourriture de nature bactérienne (*E. coli* souche MG-16-55), plus pratique pour observer des organismes de petite taille.

La multiplication des bactéries a été réalisée stérilement sous une hotte à flux laminaire. Dans un premier temps, les bactéries ont été cultivées sur un milieu solide de Lennox L Agar (32 g/l) dans des boîtes de Petri afin d'obtenir des colonies. Dans le but d'avoir une nourriture sous forme liquide, du Luria Broth Base (20 g/l) a été préparé et stérilisé par autoclave. En conditions stériles, une colonie bactérienne est piquée dans la boîte de Petri et mélangée au LB liquide pour ensuite être incubée durant 16 h à 37°C. Par la suite, le LB liquide est centrifugé à 6000 tours/minute à 4°C durant 15 minutes et le culot de bactéries est resuspendu avec de l'eau de Volvic filtrée selon le volume choisi et conservé à 4°C.

c. Période d'acclimatation

Après la vérification de la clonalité des cultures et l'identification de l'espèce de Bdelloïde isolée au départ, un grand nombre d'individus préalablement lavés dans de l'eau de Volvic filtrée ont été transférés dans de grandes boîtes de Petri contenant une couche de 0,5 cm de CMA 25 g/l. Ce transfert a été réalisé pour les 5 cultures soumises au séquençage. Durant une période de 3 semaines, les clones ont été nourris avec des bactéries de l'espèce *E. coli* et placés dans un incubateur à une température de 21°C. Après cette période d'acclimatation, la culture caractérisée par la population la plus importante a été sélectionnée pour réaliser la suite des expériences.

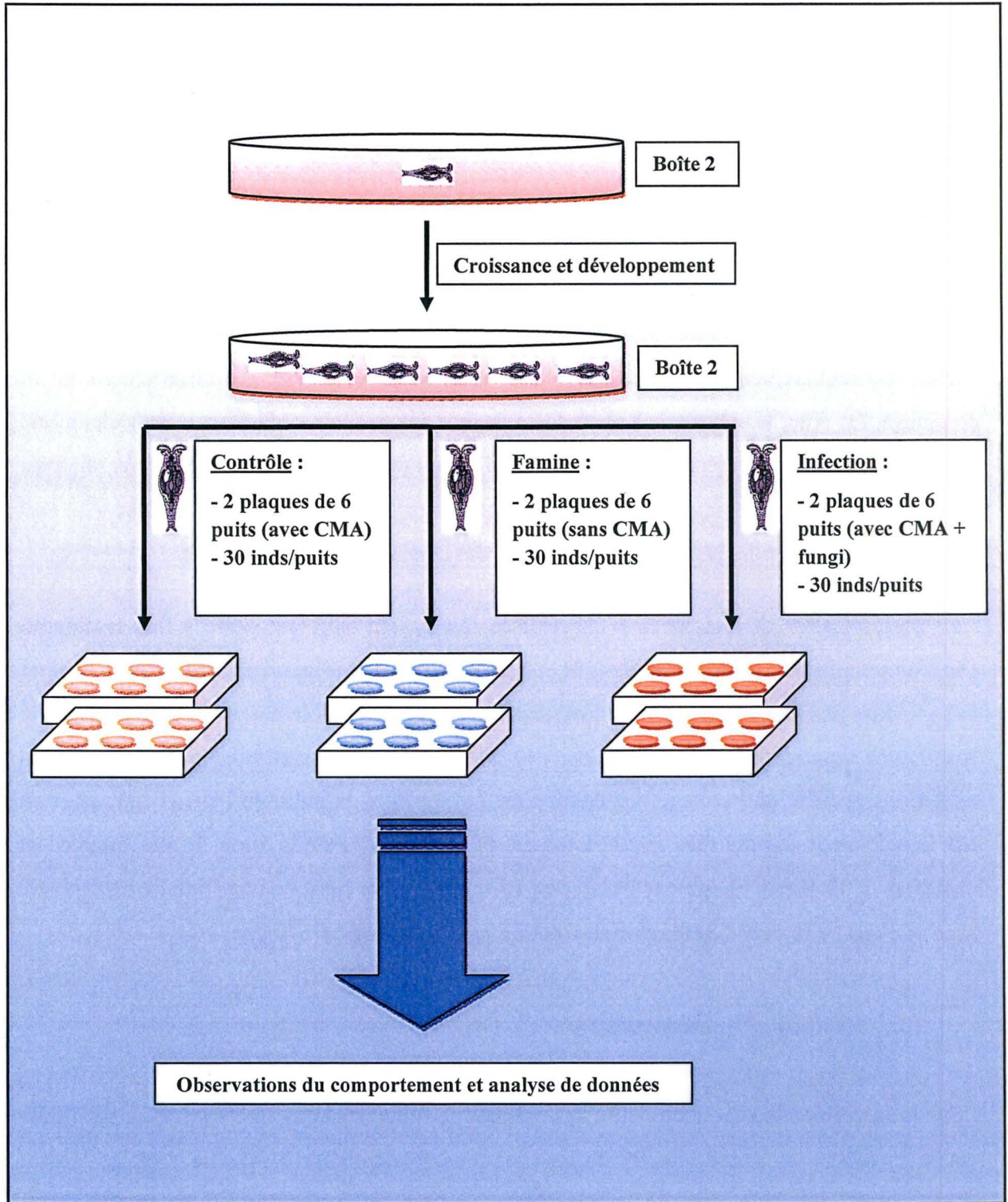


Fig. 13. Dispositif expérimental mis en place dans le but de suivre des populations composées initialement de 30 individus exposés à différents stress.

2) Suivi des populations soumises à différents stress

a. Dispositif expérimental

Un ensemble de 6 plaques de 6 puits a été utilisé dans le but d'évaluer trois traitements différents sur l'évolution de plusieurs paramètres biologiques chez *Adineta vaga* (Fig. 13). Dans chacun des puits ont été placés 30 individus préalablement lavés avec de l'eau de Volvic filtrée. Dans deux des six plaques *R. angustipora* a été inoculé sur 6 ml de CMA 25 g/L jusqu'à ce que le mycélium forme un tapis d'environ 2 cm de diamètre. Deux autres plaques de 6 puits ont été utilisées comme contrôles et comprenaient uniquement 6 ml de CMA 25 g/L. Deux plaques de 6 puits ont également été utilisées pour constituer un stress de type famine. Ces deux dernières plaques ne comprenaient pas de CMA car cette substance constitue une source de nourriture pour les bactéries ainsi que pour les rotifères. Les individus correspondant aux traitements infection et contrôle ont toujours été nourris de la même façon, c'est-à-dire régulièrement avec un même volume de suspension bactérienne, tandis que les individus correspondant au traitement famine n'ont jamais reçu de nourriture.

Parmi le lot de deux plaques de 6 puits par traitement, une des boîtes a servi aux observations et à l'évaluation de différents paramètres biologiques, tandis que l'autre plaque a été utilisée pour évaluer le mode de repliement et les modifications morphologiques induites par les différents traitements.

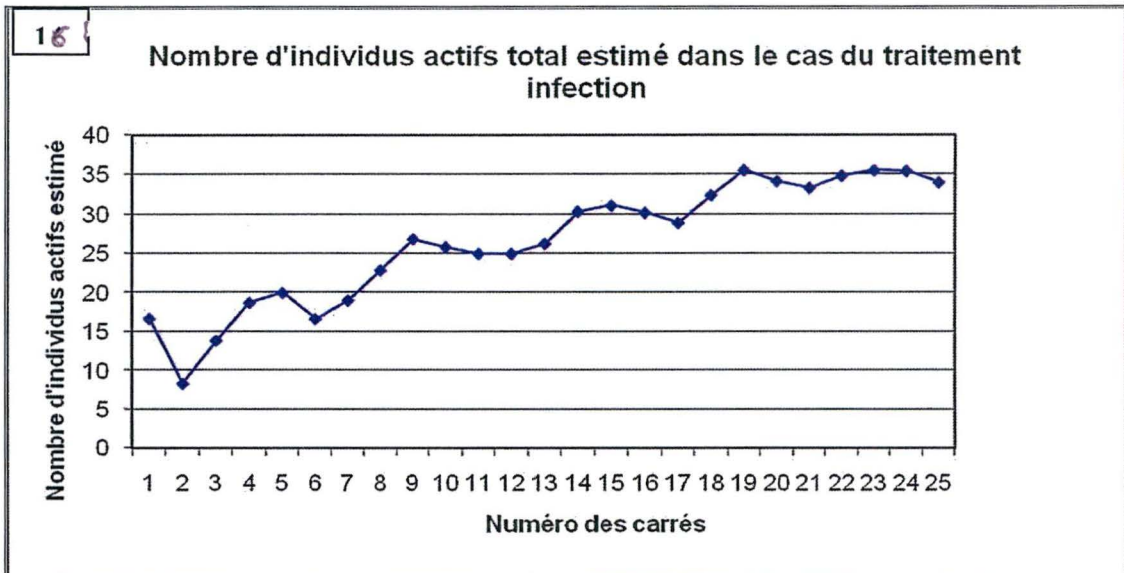
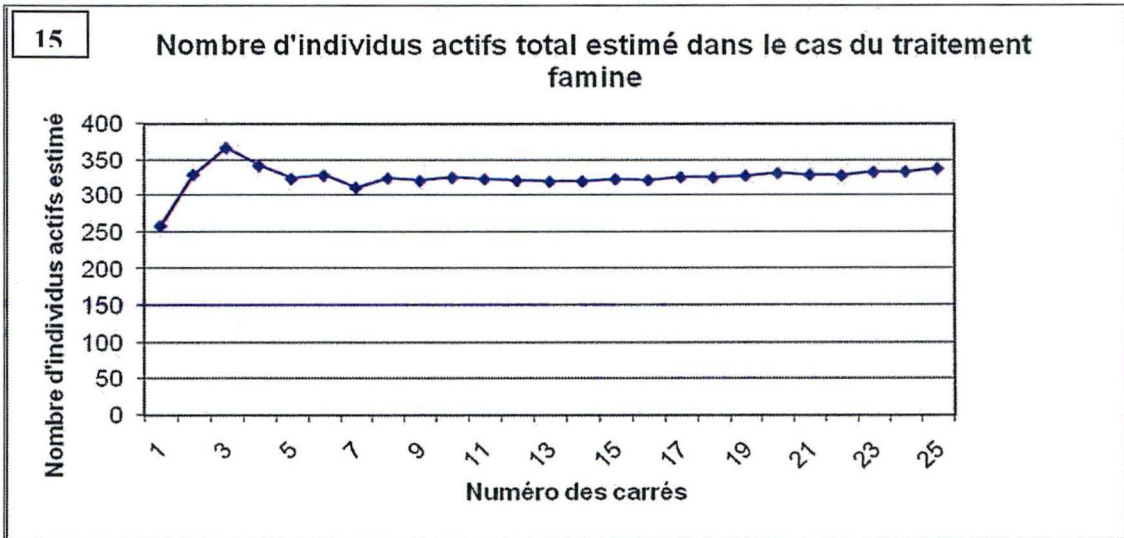
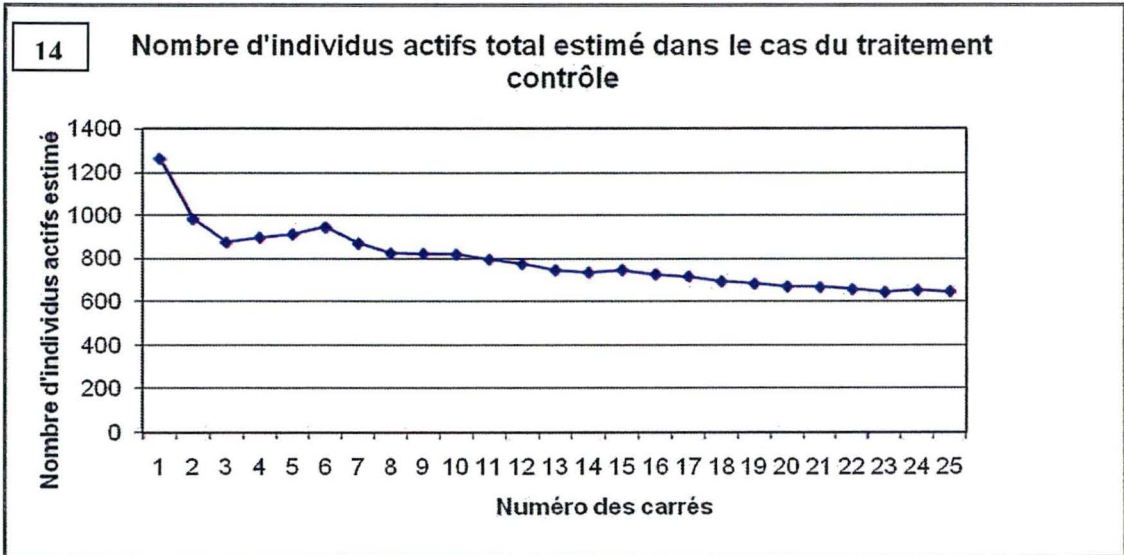
b. Paramètres évalués

Dans le but d'évaluer les interactions écologiques entre le champignon parasite *Rotiferophthora angustispora* sur son hôte *Adineta vaga*, différentes variables et leur évolution ont été suivies durant 10 semaines d'observations. Toutes les semaines, pour chacun des 6 puits, nous avons estimé le nombre d'individus **actifs**, le nombre d'individus **morts**, le nombre d'**œufs**, le nombre d'individus **stressés** et le nombre d'individus **infectés** par le champignon. L'estimation de l'évolution de ces différentes variables a permis de définir certains paramètres qui permettent de comprendre comment évoluent les populations exposées à trois stress différents. L'évolution du nombre d'individus actifs permet d'estimer la présence et l'intensité d'un stress.

Afin de comprendre comment évolue la mortalité des individus, le nombre d'individus morts estimé à chaque temps a été rapporté sur le nombre d'individus totaux observés à ce même temps dans les différentes conditions pour obtenir un pourcentage. Le nombre d'individus totaux comprend l'ensemble des individus morts, l'ensemble des individus actifs, l'ensemble des individus stressés, ainsi que l'ensemble des individus infectés dans le cas du traitement infection. Dans le cas de ce dernier, le nombre d'individus infectés est également comptabilisé parmi le nombre de morts. L'évolution du pourcentage d'individus stressés a également été évaluée en rapportant le nombre d'individus stressés observé sur le nombre d'individus actifs additionné du nombre d'individus stressés. Afin d'estimer l'évolution de la fécondité des femelles, un estimateur a été créé en rapportant le nombre d'œufs pondus estimé à chaque comptage sur le nombre de femelles actives estimé lors de ce même comptage. Ces résultats ne représentent donc pas le nombre d'œufs pondus par une femelle au cours de sa vie (il aurait fallu réaliser des tables de survie pour avoir de tels résultats), mais représente un instantané qui permet d'évaluer la fécondité des femelles. Et enfin, le pourcentage d'individus infectés a également été estimé dans le cas du traitement infection en rapportant le nombre d'individus infectés sur le nombre total d'individus vivants auquel a été additionné le nombre d'individus infectés. Ce paramètre permet de caractériser la manière dont évolue l'infection.

c. Le comptage

Une fois par semaine durant la durée de l'expérience, un comptage des formes actives, des formes stressées, des formes infectées, du nombre de morts et du nombre d'œufs a été réalisé en utilisant un stéréomicroscope Zeiss Stemi 2000 et une grille transparente tapissée de carrés d'une surface de $0,25 \text{ cm}^2$. Durant les premières semaines, la totalité des individus a été comptée (30 au début de l'expérience). Cependant, rapidement, il est devenu de plus en plus difficile de compter tous les organismes. Une estimation empirique a donc été réalisée afin d'évaluer le nombre optimal de carrés à prendre en considération lors du comptage et ce pour chaque condition dans le but d'optimiser l'estimation. Cette estimation a nécessité le comptage des individus présents sur chaque carré (sur une surface comportant 25 carrés de $0,25 \text{ cm}^2$ de surface, soit une surface totale $6,25 \text{ cm}^2$) pour chacune des conditions. Le comptage réalisé pour un carré a ainsi été ajouté à l'addition précédente et l'ensemble a été multiplié par le nombre adéquat permettant d'obtenir une estimation sur une surface de $6,25 \text{ cm}^2$. La démarche a été effectuée pour deux puits dans le cas du traitement contrôle, trois



Figs. 14-15-16. Ensemble des graphiques qui, pour chaque traitement, a permis de déterminer le nombre optimal de carrés sur lesquels réaliser un comptage pour obtenir une bonne estimation finale du nombre total d'individus actifs présents dans chacun des puits.

puits dans le cas du traitement famine et du traitement infection. Les moyennes obtenues pour chacun des traitements ont permis d'obtenir une courbe permettant de visualiser le nombre adéquat de carrés à prospector pour une bonne estimation du nombre d'individus actifs (**Figs. 14, 15 et 16**). Dans le cas du traitement contrôle, un comptage réalisé sur 13 carrés permet d'obtenir une bonne estimation. Dans le cas du traitement famine, 10 carrés sont suffisants, alors que dans le cas du traitement infection, 19 carrés sont nécessaires. Bien que la démarche ait été réalisée en comptant le nombre d'individus actifs, le même nombre de carrés a été utilisé pour évaluer le nombre d'œufs, d'individus morts, d'individus stressés ou encore d'individus infectés dans le cas du traitement infection. Pour obtenir le nombre total d'individus présent dans un puits, le nombre d'individus comptabilisés pour le nombre de carrés définis a été multiplié par le facteur adéquat.

Néanmoins, il est devenu très difficile par la suite de comptabiliser le nombre d'individus actifs après une période d'environ deux semaines pour le traitement contrôle et un mois pour le traitement infection. Par conséquent, le comptage a alors été réalisé sur un même nombre de carrés, mais d'une surface de 0,04 cm².

d. Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant Excel et le logiciel XLSTAT version 7.5.2 développé par la société Addinsoft. Le fonctionnement de ce dernier s'appuie sur Microsoft Excel pour la saisie des données et la publication des résultats. Son utilisation a été faite après comparaison des résultats relatifs à l'analyse de la variance obtenus avec XLSTAT et ceux obtenus en utilisant Excel de manière « classique ». Les résultats s'étant révélés identiques par les deux approches, XLSTAT a été utilisé car il permet de réaliser des tests de comparaisons multiples.

Les analyses de la variance à 2 voies (ANOVA 2) ont été réalisées après vérification de la normalité des échantillons par le test de Shapiro-Wilk. L'homoscédasticité a été vérifiée en utilisant le test de Bartlett. Une transformation des données selon la formule *Arc sinus* pourcentages d'individus vivants a été nécessaire pour comparer les moyennes de pourcentage d'individus vivants. Lorsqu'il y a eu hétérogénéité des variances, une transformation logarithmique des valeurs a été réalisée. Quand l'analyse de la variance révélait l'existence d'une moyenne au moins différente des autres, un test post-hoc de Tukey a été réalisé.

Etant donné que deux des puits de la plaque à 6 puits correspondant au traitement infection ont manifesté après une semaine une absence d'individus vivants, quatre puits pris au hasard dans le cas des traitements famine et contrôle ont été utilisés pour les différentes estimations et analyses. Cependant, l'ensemble des puits a été pris en compte pour évaluer l'évolution du pourcentage d'individus infectés au cours du temps dans le cas du traitement infection.

3) Protocole de dessiccation

Deux plaques de 6 puits ont été utilisées afin de soumettre des individus à des conditions d'anhydrobiose dans le but d'observer les modifications morphologiques et de comparer ces dernières aux modifications morphologiques induites par les traitements famine et infection. Une série d'individus préalablement lavés dans de l'eau de Volvic filtrée a été déposée sur une couche d'LMP 3% (Low melting point) dans deux plaques de 6 puits. Un mois et demi a été nécessaire pour que le LMP soit totalement sec et les animaux desséchés. Une partie des puits a été utilisée pour les analyses microscopiques, tandis que d'autres ont été employées pour vérifier la survie des organismes après réhydratation du milieu.

III. Analyse microscopique

1) Microscopie photonique

Les différences morphologiques du repliement d'*Adineta vaga* exposée aux différents stress (manque d'eau, manque de nourriture et exposition à un parasite) ont été examinées à l'aide d'un microscope photonique Leitz Diaplan pourvu d'une caméra vidéo JVC KY-F50. La technique de contraste de phase a été utilisée pour réaliser les observations et les différentes photos car elle a l'avantage de permettre l'observation rapide de matériel frais non coloré.

2) Microscopie électronique à balayage

a. Préparation du fixateur FGP

Le fixateur utilisé pour fixer des individus stressés résultant des traitements famine et infection est le FGP (Formaldehyde-Glutaraldehyde Picric Acid), fréquemment employé pour

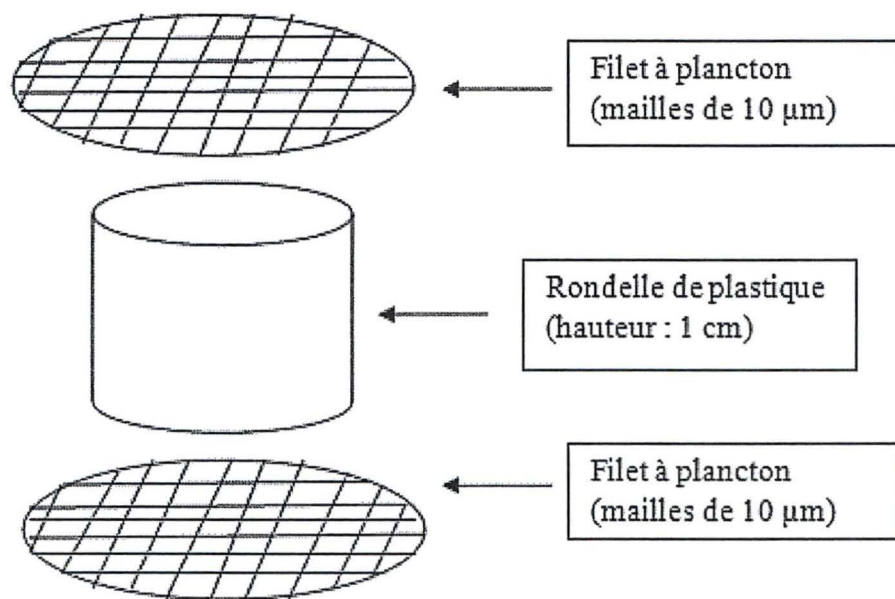


Fig. 17. Dispositif permettant de prévenir les pertes des rotifères lors de leur préparation pour la microscopie électronique à balayage. Les filets à plancton sont maintenus au tube à l'aide de petits élastiques. Les individus sont d'abord disposés sur le filet inférieur ; le filet supérieur est placé après la fixation, jute avant le contournement du point critique (cela permet de vérifier le bon déroulement de la fixation au stéréomicroscope).

fixer divers tissus biologiques. 1 g de paraformaldéhyde est chauffé dans 7,58 ml d'eau déionisée dans un bécher de 50 ml jusqu'à ce que le liquide commence à chauffer, sans faire bouillir le mélange. 2 à 4 gouttes de NaOH 0,1 N sont ensuite ajoutées. 1,92 ml de solution d'acide picrique saturée sont additionnés à la solution chaude. Après la dissolution de l'acide picrique, sont ajoutés 22 ml de solution tampon cacodylate de sodium 0,2 M et 0,1 M de CaCl₂ 5%. Après refroidissement de la solution, il est nécessaire d'ajuster le pH entre 7,3 et 7,4 avec du NaOH 1N. L'osmolarité a été ajustée à 250 mOsm à l'aide d'un osmomètre afin d'éviter les chocs osmotiques qui peuvent modifier la forme des organismes. La solution est ensuite conservée à 4°C.

b. Création d'un support

La difficulté de la préparation des rotifères pour la microscopie électronique à balayage résulte principalement de leur petite taille. En effet, la préparation des organismes nécessite un grand nombre de transferts dans différentes substances et le risque de perdre la plupart des organismes est important. Par conséquent, j'ai réalisé un dispositif pour prévenir de telles pertes (Fig. 17). Ce dernier consiste en de petites rondelles de plastique dont l'une des extrémités est fermée par un morceau de filet à plancton maintenu par un élastique. L'espèce *Adineta vaga* étant caractérisée par une taille d'environ 100 µm à l'état actif et une taille d'environ 40 µm à l'état stressé, un filet constitué de mailles de 10 µm a été choisi pour réaliser le dispositif. Les animaux sont ainsi déposés sur le filet du dispositif, fermé par la suite à l'autre extrémité par un autre morceau de filet maintenu à l'aide d'un élastique. Les organismes sont ainsi prisonniers et ne peuvent s'échapper lors des différents traitements, mais restent en contact avec les différentes solutions.

c. La préparation des échantillons

La fixation au FGP développée ici a été réalisée pour toutes les formes stressées, à l'exception des formes dessiquées. Dans un premier temps, les rotifères sont prélevés de leur milieu et transférés dans le dispositif décrit précédemment. Aucun lavage préalable n'a été réalisé, car les individus stressés sont particulièrement sensibles au changement de leur environnement et peuvent rapidement revenir à l'état actif. Le support dans lequel se trouvent les rotifères est transféré dans un puits contenant un mélange constitué de 0,5 ml d'OsO₄ 1%

et 0,5 ml de FGP. Une incubation d'1h30 est nécessaire pour que la fixation s'opère de manière optimale.

Après l'étape de fixation, les animaux sont rincés 10 x dans de l'eau distillée afin d'enlever l'OsO₄ et le FGP. Par la suite, les organismes sont déshydratés : l'eau contenue dans les animaux est progressivement remplacée par de l'éthanol. Cette déshydratation nécessite un passage par différentes concentrations d'éthanol. Les rotifères sont d'abord placés dans un puits contenant 1ml d'éthanol 20%, puis 10 minutes dans 1 ml d'éthanol 30%. Le même protocole est nécessaire pour des concentrations de 40%, 50%, 60% et 70%. A l'étape de concentration 70%, les animaux peuvent éventuellement être conservés à 4°C. Par la suite, les échantillons sont transférés dans 1 ml d'éthanol 80%, 90% et enfin 100%. Le passage à la concentration 100% implique que les échantillons soient traités 3x10 minutes. Ces changements graduels de concentration sont nécessaires afin d'éviter les brusques changements d'osmolarité qui pourraient altérer la forme des organismes.

Dans le cas des individus dessiqués, les individus sont d'abord fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% et de cacodylate 0,1 M durant 2h 30, suivi de 3 rinçages de 10 minutes au tampon cacodylate 0,2 M. Une seconde fixation assurée par un mélange d'acide osmique 1% et de tampon cacodylate 0,1 M a été réalisée durant une heure. Une fois la deuxième fixation réalisée, les échantillons ont été conservés à 4°C.

d. Le contournement du point critique

Une fois l'eau présente dans l'organisme remplacée par l'éthanol, l'échantillon subit alors une déshydratation réalisée par passage au point critique. Les organismes dessiqués, déjà déshydratés, n'ont pas été soumis à cette étape qui ne concerne donc que les formes stressées hydratées. L'échantillon, immergé dans l'éthanol 100%, est transféré dans la chambre d'un appareil à point critique afin de remplacer l'éthanol présent par du CO₂. Le remplacement des fluides se réalise à leur point critique, c'est-à-dire dans des conditions de pressions et de températures telles que l'éthanol et le CO₂ se trouvent dans une phase instable caractérisée par l'absence de tension superficielle. C'est cette étape cruciale qui permet aux échantillons de conserver leur forme et leur volume : l'échantillon est séché sans être détruit. Le contournement du point critique a été réalisé par un appareil Balzers CPD 030.

e. La métallisation

Les échantillons déshydratés ont été introduits dans la chambre de métallisation d'un métalliseur Balzers Union. Soumis à un vide intense, ils ont été recouverts d'une couche d'or de 25 nm afin d'augmenter leur conductivité électrique.

f. Les observations

Les observations des échantillons ont été réalisées avec un microscope électronique à balayage Philips XL 20.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

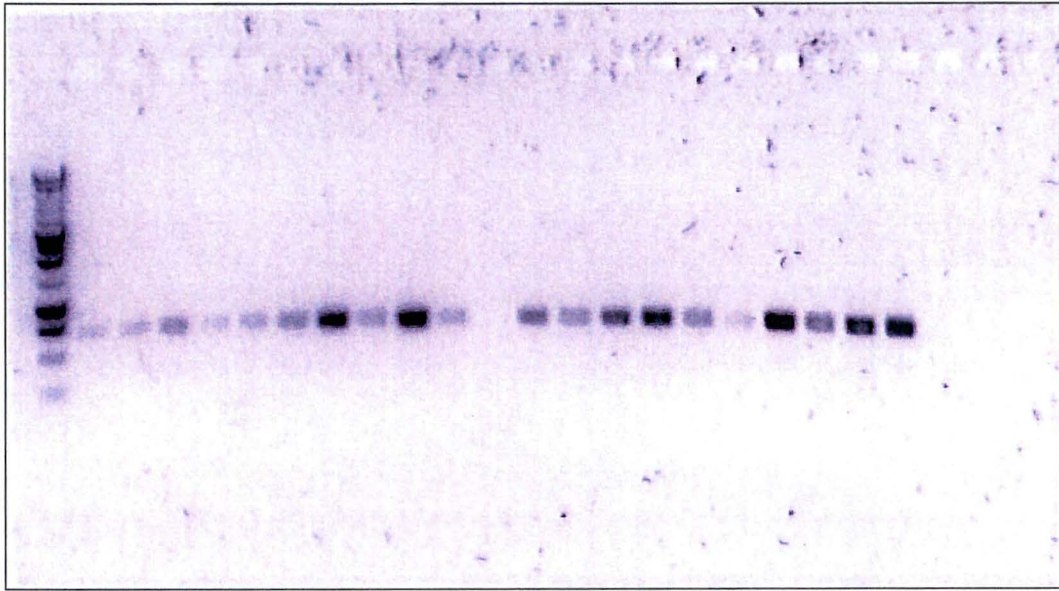


Fig. 18. Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose pour 20 échantillons. Les produits PCR ont été séparés en utilisant de l'agarose 1% dans du tampon TEA.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ079961.1	Adineta vaqa cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial c	1123	1123	99%	0.0	99%	
AY218092.1	Adineta vaqa cytochrome c oxidase subunit I gene, partial cds; r	1123	1123	99%	0.0	99%	
EF173240.1	Adineta vaqa isolate UK.8.1 cytochrome oxidase subunit I (COI)	1112	1112	99%	0.0	99%	
DQ089725.1	Adineta vaqa cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mi	1107	1107	99%	0.0	99%	
DQ078512.1	Adineta vaqa clone WAv1/1 cytochrome oxidase subunit 1 (cox1'	1048	1048	92%	0.0	99%	
EF173244.1	Adineta vaqa isolate FR.3.2 cytochrome oxidase subunit I (COI)	961	961	85%	0.0	99%	
EF173200.1	Adineta sp. FR.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	811	811	99%	0.0	90%	
EF173210.1	Adineta sp. TZ.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	791	791	99%	0.0	89%	
EF650559.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.CH.1 cytochrome oxidas	758	758	99%	0.0	88%	
EF173203.1	Adineta sp. MX.1.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	752	752	99%	0.0	88%	
EF650558.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.UK.7 cytochrome oxidas	747	747	98%	0.0	88%	
EF650560.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.CH.2.1 cytochrome oxide	745	745	97%	0.0	88%	
EF173211.1	Adineta sp. TZ.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	741	741	99%	0.0	88%	
EF173216.1	Adineta vaqa isolate UK.1.4 cytochrome oxidase subunit I (COI)	737	737	99%	0.0	88%	
EF173250.1	Adineta vaqa isolate UK.12 cytochrome oxidase subunit I (COI) c	732	732	99%	0.0	88%	
EF173232.1	Adineta vaqa isolate NZ.1.3 cytochrome oxidase subunit I (COI)	728	728	93%	0.0	89%	
EF173243.1	Adineta vaqa isolate FR.3.1 cytochrome oxidase subunit I (COI)	725	725	99%	0.0	87%	
EF173208.1	Adineta sp. FR.5 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	725	725	99%	0.0	87%	
EF173230.1	Adineta vaqa isolate NZ.1.1 cytochrome oxidase subunit I (COI)	721	721	93%	0.0	89%	
EF650552.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.UK.6.2 cytochrome oxide	717	717	98%	0.0	87%	
EF173215.1	Adineta vaqa isolate UK.1.3 cytochrome oxidase subunit I (COI)	715	715	96%	0.0	88%	
EF173207.1	Adineta sp. FR.4 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	715	715	97%	0.0	87%	
EF173254.1	Adineta vaqa isolate TZ.2.1 cytochrome oxidase subunit I (COI)	713	713	99%	0.0	87%	
EF173201.1	Adineta sp. UK.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	713	713	99%	0.0	87%	
EF650551.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.UK.6.1 cytochrome oxide	712	712	97%	0.0	87%	
EF173220.1	Adineta vaqa isolate G3P11B5 cytochrome oxidase subunit I (CO	710	710	92%	0.0	88%	
EF173227.1	Adineta vaqa isolate FR.2.2 cytochrome oxidase subunit I (COI)	708	708	97%	0.0	87%	
DQ078520.1	Habrotrocha constricta clone Whc1/1 cytochrome oxidase subuni	706	706	92%	0.0	88%	
EF173191.1	Adineta sp. AN.2.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	704	704	98%	0.0	87%	
EF173184.1	Adineta grandis isolate AN.1.1 cytochrome oxidase subunit I (CO	702	702	98%	0.0	87%	
EF173212.1	Adineta steineri isolate IT cytochrome oxidase subunit I (COI) ge	701	701	99%	0.0	87%	
EF173223.1	Adineta sp. UK.3.2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	697	697	99%	0.0	87%	
EF173196.1	Adineta sp. UK.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, parti	697	697	98%	0.0	87%	
EF650564.1	Uncultured bdelloid rotifer isolate Undet.TZ.2 cytochrome oxidas	695	695	99%	0.0	87%	
EF173222.1	Adineta sp. UK.3.1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, pa	695	695	98%	0.0	87%	

Fig. 19. Séquences pour lesquelles les alignements sont significatifs avec la séquence « query ».

I. Vérification de la clonalité des cultures

1) Vérification de la clonalité

Premièrement les gels d'électrophorèses (**Fig. 18**) montrent que l'amplification du gène COI des différents individus testés a fonctionné : nous avons une bande à 657 pb comme prévu et le contrôle négatif n'amplifie rien, ce qui indique l'absence de contamination. L'alignement multiple réalisé avec ClustalW a permis de montrer que toutes les séquences sont identiques. Par conséquent, il y a une forte chance que les cultures soient bien composées d'individus clones et qu'elles n'aient donc pas été contaminées par tout individu de génotype différent. Les organismes cultivés étant génétiquement identiques, leur utilisation dans les expériences relatives à l'évaluation de différents paramètres écologiques au cours du temps permet d'éviter la variabilité génétique et de réduire l'introduction de variabilité individuelle.

2) Identification de l'espèce modèle

Les résultats obtenus après réalisation du blastn montrent que la séquence analysée appartient sans aucun doute à *Adineta vaga*. Plusieurs éléments nous permettent de l'affirmer avec certitude. Premièrement, les E-values (« expectation values ») sont très faible (**Fig. 19**), ce qui signifie que l'alignement est fiable et que le résultat n'est pas aléatoire. En effet, l'E-value estime la chance de trouver le même résultat par hasard. Ensuite, les scores des premières séquences sont élevés, ce qui indique que les séquences sont très similaires : les six premières réponses montrent qu'il s'agit d'une partie du gène codant pour la première unité du cytochrome oxydase d'*Adineta vaga*. Les réponses obtenues au niveau du schéma graphique (**Fig. 20**) sont rouges ; cela veut dire que le pourcentage de similarité entre la séquence « query » et les séquences proposées est très élevé (>200 pb). En conclusion, l'espèce cultivée venant d'une population prélevée à Malonne est bien *Adineta vaga*.

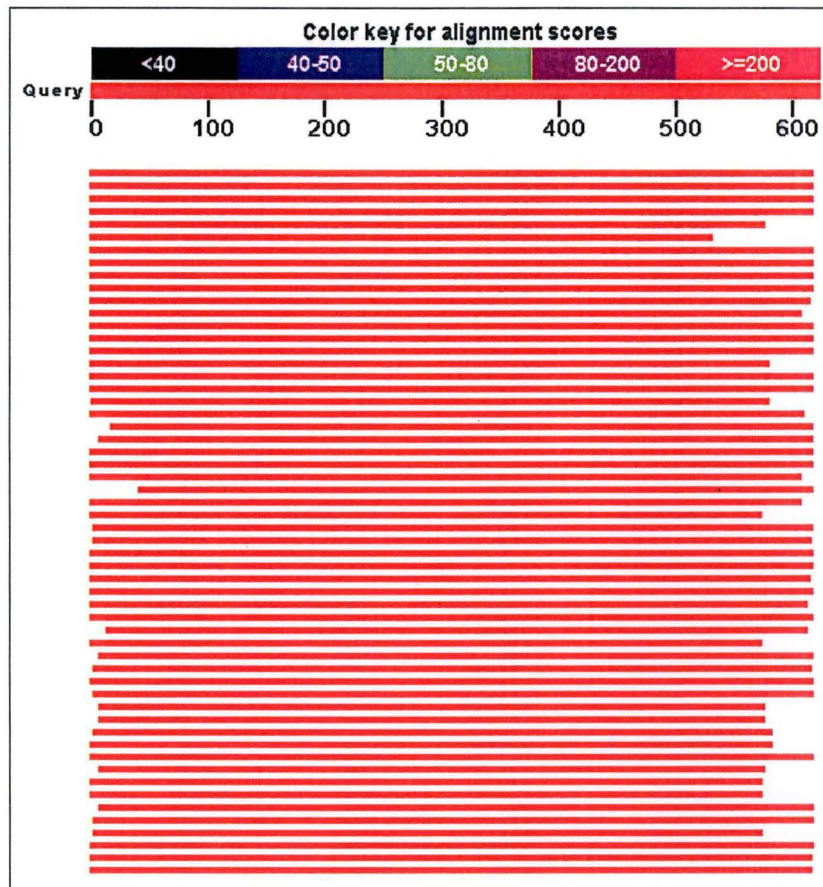


Fig. 20. Schéma graphique des séquences pour lesquelles les alignements sont significatifs.

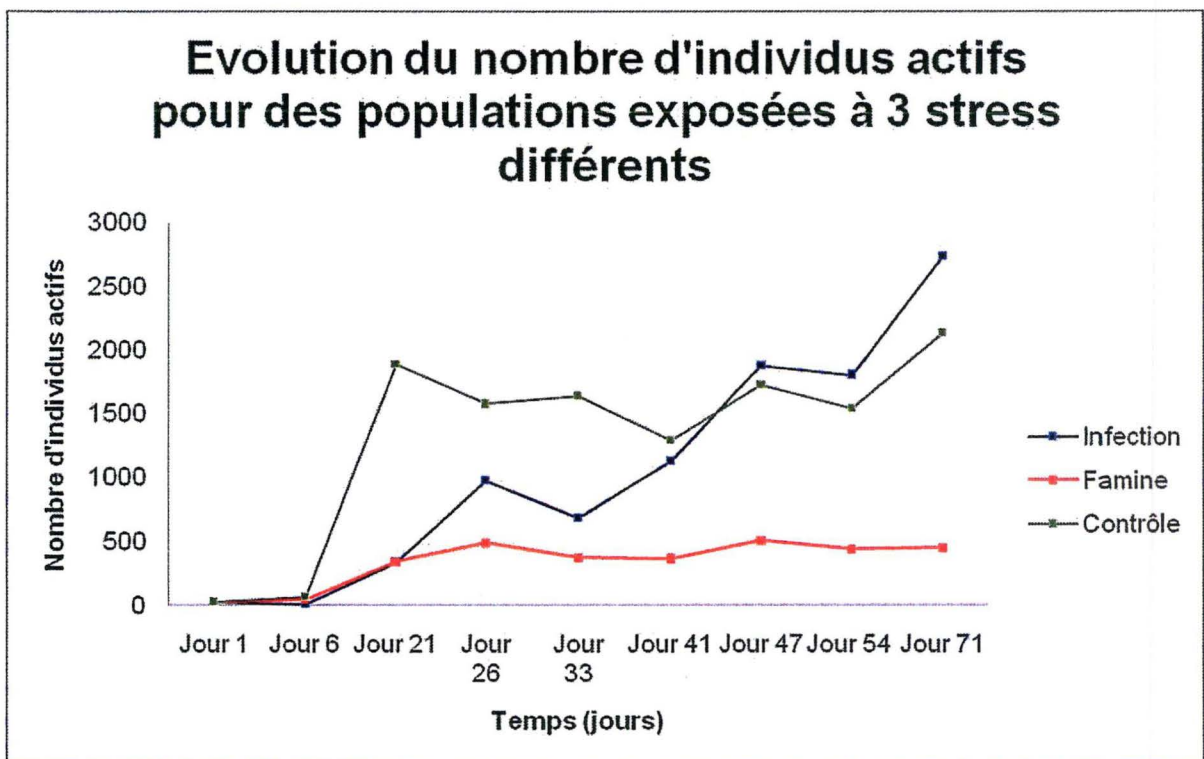


Fig. 21. Evolution du nombre d'individus actifs au cours du temps pour des populations exposées à 3 conditions de stress différentes.

II. Observations écologiques

1) Evolution des différents paramètres au cours du temps

a. *Evolution du nombre d'individus actifs au cours du temps*

a.1 Description des résultats

La **figure 21** représente un graphique qui illustre l'évolution du nombre d'**individus actifs** au cours du temps pour l'ensemble des trois traitements. Dans le cas de la population initialement composée de 30 individus exposés à une absence prolongée de nourriture (**le traitement famine**), on constate une augmentation progressive du nombre d'individus actifs au cours des 26 premiers jours qui atteint près de 500. Par la suite, la population se stabilise et le nombre d'individus actifs oscille entre 350 et 500 jusqu'à la fin des observations. Au 71^{ème} jour, le nombre d'individus actifs est d'environ 450. Dans le cas de la population initialement composée de 30 individus et exposée au parasite fongique (**le traitement infection**), on constate une diminution du nombre d'individus durant les 6 premiers jours. Par la suite, le nombre d'individus actifs augmente progressivement et atteint plus de 2 500 individus actifs à la fin des observations. Concernant la population initialement composée de 30 individus et non soumise à un stress (**le traitement contrôle**), on constate une augmentation rapide du nombre d'individus actifs : près de 2 000 individus actifs sont présents en moyenne dans chacun des puits au 21^{ème} jour. Par la suite, le nombre d'individus actifs fluctue légèrement entre 1 500 et 2 000 et ce, jusqu'à la fin des observations.

La **comparaison des 3 courbes** permet de réaliser quelques observations intéressantes. Tout d'abord, on remarque que le nombre d'individus actifs relatif au traitement famine reste faible et constant, comparé aux autres traitements. Ensuite, on constate un décalage entre la courbe correspondant au traitement infection et la courbe correspondant au traitement contrôle : le nombre d'individus actifs augmente plus rapidement dans le cas du contrôle. Cependant, les deux courbes se rejoignent entre le 41^{ème} et le 47^{ème} jour et, très curieusement, le nombre d'individus actifs exposés au parasite finit par dépasser le nombre d'individus actifs relatif au traitement contrôle. Ce dépassement est maintenu jusqu'à la fin des observations.

a.2 Analyse et interprétation des résultats

Les résultats obtenus pour le **traitement famine** suggèrent qu'après 26 jours, les individus ont épuisé la faible quantité de nourriture présente dans leur milieu venant de bactéries qui se développent sur leurs déchets métaboliques après leur transfert. Le nombre d'individus actifs cesse donc de croître. L'allure de la courbe obtenue suggère que l'évolution du nombre d'individus actifs suit un modèle de croissance logistique : la compétition intraspécifique résultant de la naissance de nouveaux individus réduit la croissance de la population, jusqu'au point où la densité a atteint la capacité de support du milieu. Cette dernière est définie comme le nombre maximal d'individus d'une population qui peuvent vivre dans un milieu au cours d'une période donnée, sans dégradation de l'habitat (Campbell et Reece, 2004). La compétition entre les individus conduit donc au phénomène de densité-dépendance.

Concernant le **traitement infection**, la baisse du nombre d'individus actifs observée au cours des 6 premiers jours s'explique probablement par la virulence du champignon pathogène. Cette dernière, définie en pathologie comme la pathogénie liée à l'infection parasitaire (Thomas et al., 2007), est sans doute à son apogée au début de l'expérience. C'est en effet probablement à cette période qu'une forte quantité de spores infectieuses a été libérée dans le milieu, infectant rapidement un grand nombre d'individus (voir partie individus infectés). Ensuite, au cours de l'expérience, les milieux de cultures ont régulièrement été lavés (de la même façon pour les différents traitements), afin d'éviter la propagation de bactéries difficilement contrôlable qui rend les observations difficiles dans le cas des traitements contrôle et infection. Et, bien qu'une petite quantité d'eau ait été prélevée et remplacée, il est fort possible que la répétition de ce nettoyage soit à l'origine d'un retrait progressif de spores infectieuses durant l'évolution de l'expérience, altérant dès lors la virulence du champignon au cours du temps. Il est également possible que la virulence des spores soit limitée dans le temps et conditionnée par l'environnement : l'hydratation des spores pourrait réduire leur virulence. Il est également possible que les individus se soient progressivement acclimatés au stress parasitaire.

La croissance rapide du nombre d'individus actifs observés dans le cas du **traitement contrôle** s'explique par l'absence de stress. Et bien que les animaux aient été nourris régulièrement, ils atteignent rapidement la capacité de soutien du milieu (comme cela est observé pour les individus soumis au traitement famine). Néanmoins, dans le cas du

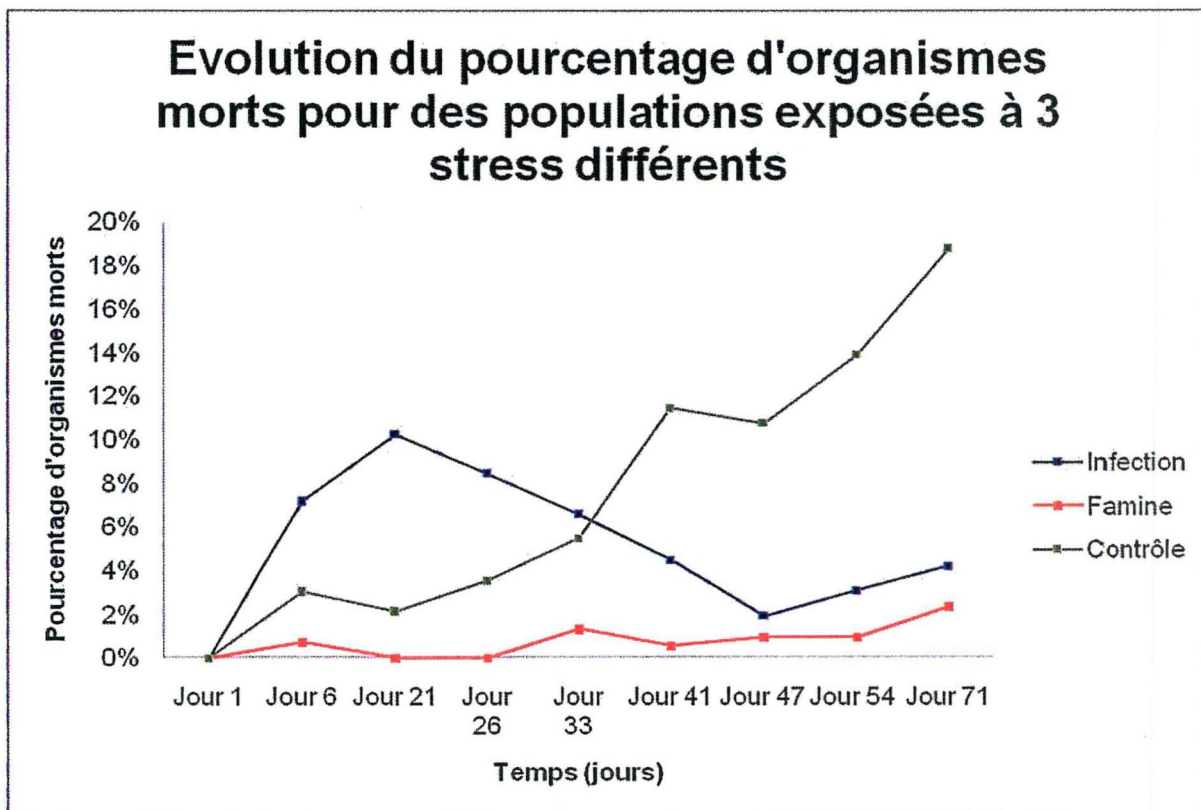


Fig. 22. Evolution du pourcentage d'organismes morts au cours du temps pour des populations exposées à 3 conditions de stress différentes.

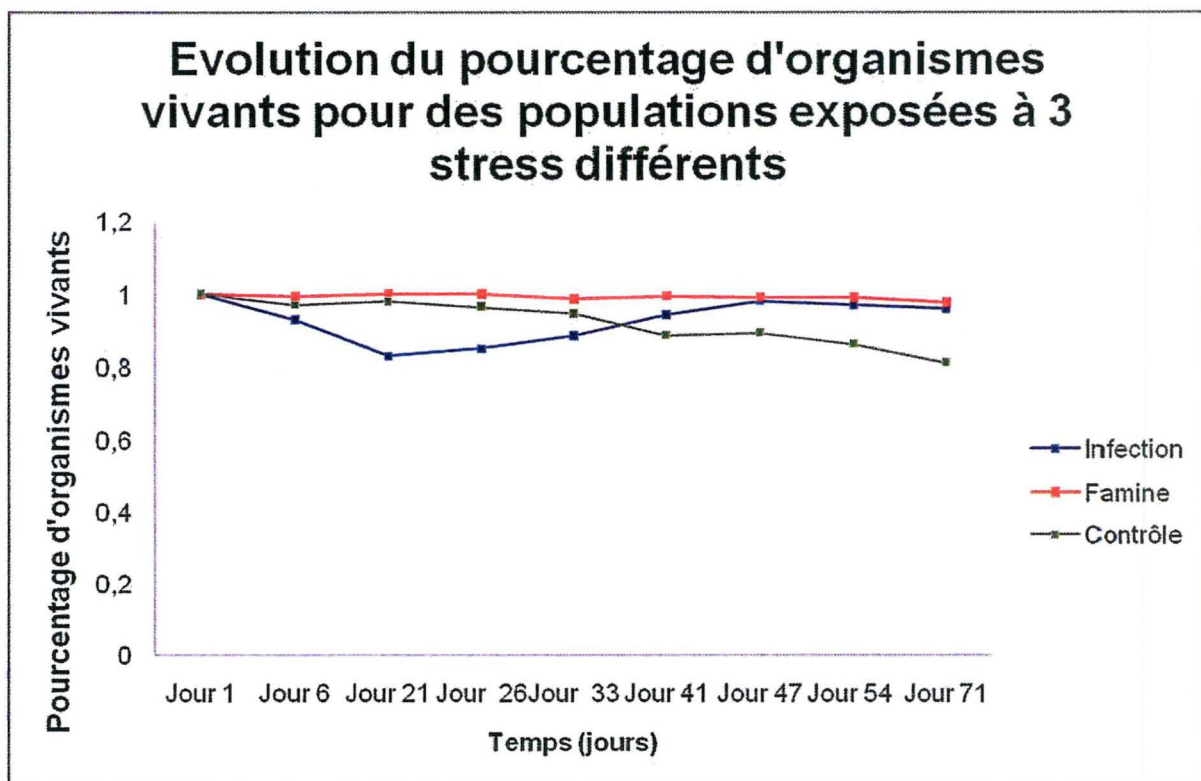


Fig. 23. Evolution du pourcentage d'organismes vivants au cours du temps pour des populations exposées à 3 conditions de stress différentes.

traitement contrôle, le nombre d'individus actifs estimé est nettement plus important que dans le cas du traitement famine : la présence plus importante de nourriture entraîne une augmentation de la capacité de soutien du milieu.

Le dépassement du nombre d'individus actifs observé sur le graphique entre le **traitement contrôle** et le **traitement infection** pourrait s'expliquer par la présence d'une plus forte concentration de nourriture disponible dans le cas du traitement infection. Bien que les populations correspondant aux traitements contrôle et infection aient été nourries de la même manière, il est possible que le champignon serve de support à la formation de tapis bactériens dans le fond des puits. Dans le cas du traitement contrôle, cette nourriture bactérienne se trouverait peut-être davantage en suspension dans le milieu, plus difficilement accessible aux organismes. *Adineta vaga* n'est en effet pas une espèce nageuse. En outre, il est également possible qu'immérgé, le champignon se dégrade progressivement et finisse par servir de nourriture aux bactéries, voire peut-être même aux rotifères.

b. Evolution du pourcentage d'individus morts et du pourcentage d'individus vivants au cours du temps

b.1 Description des résultats

La **figure 22** est un graphique qui illustre l'évolution du pourcentage **d'individus morts** au cours du temps pour l'ensemble des trois traitements. On observe que le pourcentage d'individus morts est plus important dans le cas du **traitement infection** durant les 21 premiers jours par rapport aux deux autres traitements. Ce pourcentage atteint un maximum de 10% au 21^{ème} jour. Par la suite, le pourcentage d'individus morts diminue jusqu'au 47^{ème} jour pour atteindre 2% et remonte légèrement par la suite jusqu'à la fin des observations. Le pourcentage d'individus morts dans le cas du **traitement famine** est assez faible et évolue peu au cours des observations : il fluctue légèrement entre 0 et 2%. Le pourcentage d'individus morts observés dans le cas du **traitement contrôle** évolue de façon inattendue : il augmente progressivement au cours du temps pour atteindre une valeur de 19% à la fin des observations.

La représentation graphique de l'évolution du pourcentage **d'individus vivants** au cours du temps (**Fig. 23**) a également été réalisée : les résultats sont évidemment l'inverse des résultats

obtenus pour le pourcentage d'individus morts. L'évolution du pourcentage d'organismes vivants est très stable au cours du temps en ce qui concerne le traitement famine. Par contre, il diminue rapidement dans le cas du traitement infection jusqu'au 21^{ème} jour. Après cette période, le pourcentage remonte pour atteindre un niveau proche de celui observé dans le cas du traitement famine. Concernant le traitement contrôle, le pourcentage d'individus vivants reste stable durant 26 jours, puis diminue progressivement jusqu'à la fin des observations.

b.2 Analyse et interprétation des résultats

Le pourcentage 10% d'individus morts observé pour le **traitement infection** au 21^{ème} jour est probablement le résultat de l'infection engendrée par le champignon qui entraîne le décès de nombreux individus. Ces résultats ne tiennent cependant pas compte des deux puits dans lesquels tous les individus sont morts et qui ont été écartés du traitement des données. La diminution en mortalité observée par la suite pourrait être le résultat de l'atténuation de la virulence du champignon déjà évoquée précédemment. Il est également possible que les organismes s'acclimatent au stress parasitaire.

Le faible pourcentage d'individus morts observé pour le **traitement famine** s'explique sans doute par la modification progressive du comportement des individus exposés au manque prolongé de nourriture. Nombreux sont en effet les individus qui, soumis à ce stress, rentrent dans un état d'inactivité apparente en se repliant. Ce comportement, davantage détaillé par la suite, permettrait à une partie des individus de survivre et d'attendre des conditions environnementales plus favorables avant de reprendre une activité normale et de se reproduire.

L'augmentation progressive du pourcentage d'individus morts (et donc la diminution du pourcentage d'individus vivants) dans le cas du **traitement contrôle** est difficile à comprendre : celui-ci atteint 18% à la fin des observations. Cette tendance est observée pour l'ensemble des puits, ce qui est d'autant plus intrigant. On peut à ce propos formuler deux hypothèses. Cette augmentation résulte peut-être d'un manque d'oxygène ou d'une compétition importante entre les bactéries et les rotifères pour une ou plusieurs ressources vitales. Ou peut-être cela est-ce dû à une augmentation de la concentration de certaines toxines ou de déchets métaboliques nocifs entraînant une dégradation du milieu.

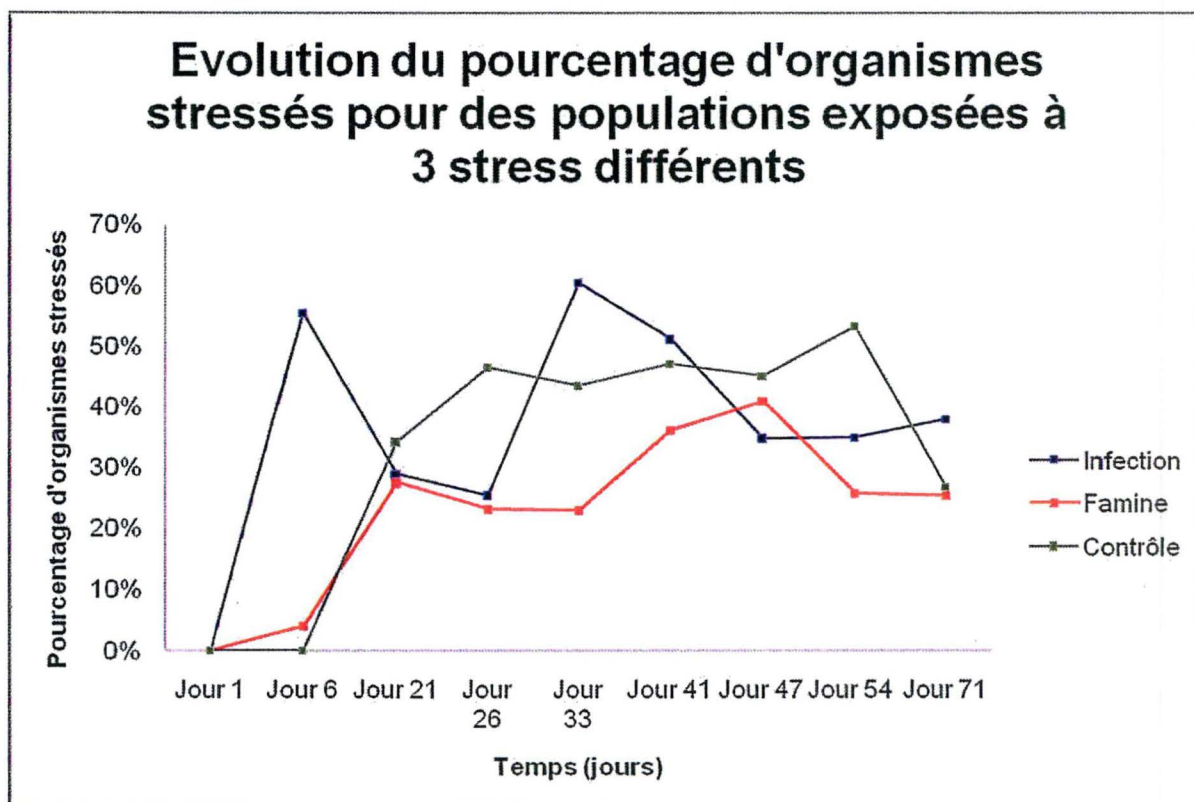


Fig. 24. Evolution du pourcentage d'organismes stressés au cours du temps pour des populations exposées à 3 conditions de stress différentes.

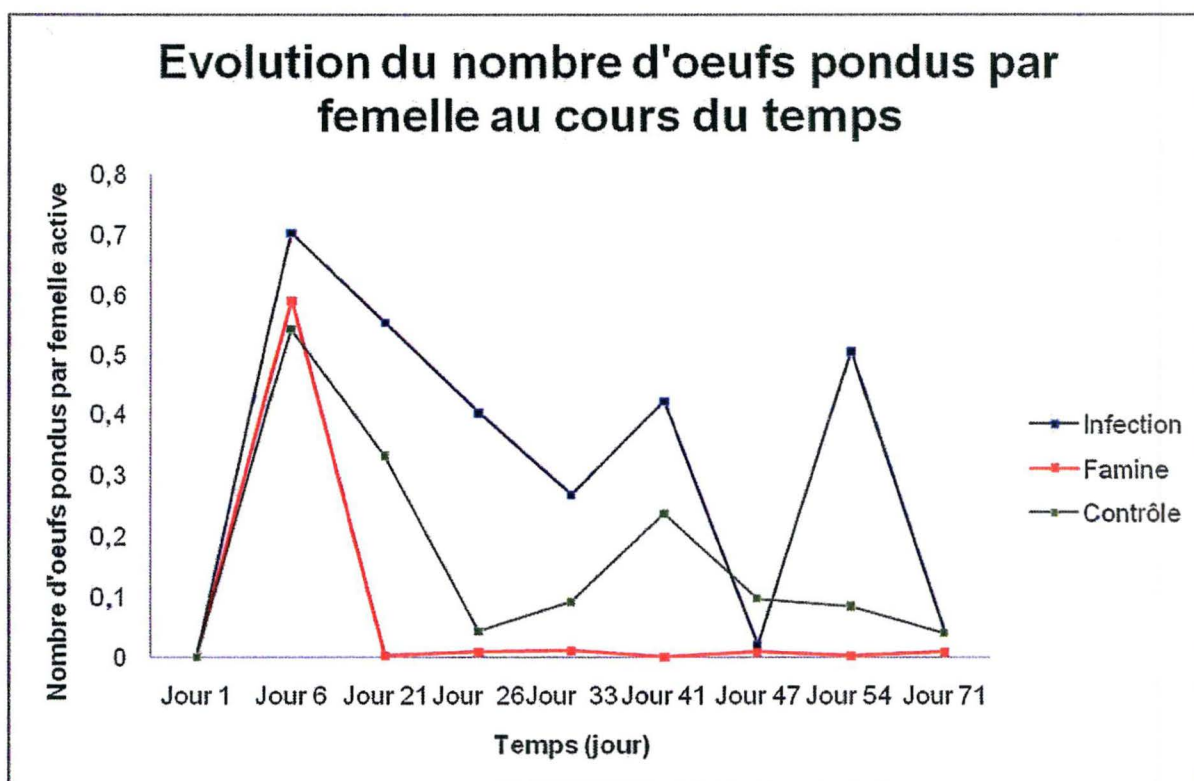


Fig. 25. Evolution du nombre d'œufs pondus par femelle au cours du temps pour des populations exposées à 3 conditions de stress différentes.

c. Evolution du pourcentage d'individus stressés au cours du temps

c.1 Description des résultats

La **figure 24** représente un graphique qui illustre l'évolution du pourcentage **d'individus stressés** au cours du temps pour l'ensemble des trois traitements. Les individus stressés se caractérisent par leur forme en boule. Dans le cas du traitement **famine**, le pourcentage d'individus stressés augmente progressivement au cours du temps. Il augmente jusqu'au 21^{ème} jour où il atteint 34%. Par la suite, ce pourcentage diminue pendant 12 jours à la suite desquels il remonte progressivement pour atteindre un maximum de 41% au 47^{ème} jour. Le pourcentage d'individus stressés diminue à nouveau jusqu'au dernier jour pour atteindre une valeur de 25%. L'évolution du pourcentage d'individus stressés dans le cas du **traitement infection** se traduit par la formation de deux pics. Le premier pic est de 56% et a lieu 6 jours après le début de l'expérience. Par la suite, le pourcentage d'individus stressés diminue jusqu'au 26^{ème} jour pour atteindre 25%. Le deuxième pic est de 61% et a lieu 33 jours après le début de l'expérience. Par la suite, ce pourcentage diminue pour atteindre 35% et se stabilise jusqu'à la fin des observations. Concernant le **traitement contrôle**, on observe une augmentation du pourcentage d'individus stressés entre le 6^{ème} et le 21^{ème} jour. Au 26^{ème} jour, ce pourcentage atteint 46% et reste assez constant jusqu'au 54^{ème} jour. Par la suite, on observe une chute du pourcentage d'individus stressés jusqu'à la fin des observations.

c.2 Analyse et interprétation des résultats

Les résultats obtenus dans le cas du **traitement famine** montrent que les individus manifestent déjà un état de stress à partir du 6^{ème} jour. Bien que l'on constate quelques fluctuations entre le 21^{ème} jour et la fin des observations, le pourcentage d'individus stressés reste assez stable au cours du temps. On observe un graphique d'allure similaire concernant l'évolution du nombre d'individus actifs tout au long de l'expérience (**Fig. 21**). Il semble donc bien, que les individus atteignent rapidement la capacité limite du milieu. Et, lorsque la nourriture vient à manquer, une partie des individus rentre dans un état d'inactivité apparente en attendant des conditions plus favorables.

Dans le cas du **traitement contrôle**, la densité de population est telle après une vingtaine de jours que certains individus rentrent dans un état d'inactivité apparente en attendant des

conditions plus favorables. De telles constatations peuvent paraître surprenantes : on pourrait se demander s'ils ne résultent pas d'un amalgame entre les individus stressés et les œufs lors du comptage. Ils peuvent avoir en effet une forme assez semblable. Cependant, l'allure du graphique est assez similaire à celle du graphique représentant l'évolution du nombre d'individus actifs au cours du temps (**Fig. 21**) : on observe également une stabilisation du nombre d'individus actifs. Par conséquent, il semble qu'à partir d'une certaine densité le milieu ne puisse plus accueillir davantage d'individus. Bien que les organismes aient été régulièrement nourris au cours de l'expérience, cela ne semble pas avoir eu d'impact important sur l'évolution du pourcentage d'individus stressés, ni même sur le nombre d'individus actifs relativement stable après le 26^{ème} jour (**Fig. 21**).

Dans le cas du **traitement infection**, le premier pic s'explique par la présence du champignon qui induit un repli des individus qui y sont exposés et qui entrent alors dans un état d'inactivité. Par la suite, la virulence du champignon semble s'atténuer et le pourcentage d'individus stressés diminue : les résultats obtenus concernant l'évolution du nombre d'individus actifs semblent confirmer cette hypothèse (**fig. 21**). Le deuxième pic résulterait quant à lui d'une augmentation importante du nombre d'individus actifs, insensibles au champignon. En puisant massivement les ressources nutritives présentes dans le milieu, certains individus rentreraient dans un état d'inactivité apparente non plus à cause du champignon, mais à cause du manque de nourriture, voire peut-être d'autres ressources.

d. Evolution du nombre d'œufs produits par femelle active au cours du temps

d.1 Description des résultats

La **figure 25** illustre l'évolution du **nombre d'œufs** produit par femelle active par jour au cours du temps pour l'ensemble des trois traitements. Rappelons qu'il s'agit bien ici d'un rapport indicateur de la fécondité des femelles : ce n'est en aucun cas le nombre d'œufs total pondus durant la vie d'une femelle mais le nombre d'œufs estimé par rapport au nombre de femelles actives estimé ce même jour. Dans le cas du **traitement famine**, le rapport atteint 0,6 au 6^{ème} jour. Par la suite, le rapport décroît rapidement : on observe à partir du 21^{ème} jour une fluctuation proche de 0 et ce, jusqu'à la fin des observations. Concernant le **traitement infection**, le rapport est de 0,7 au 6^{ème} jour. Par la suite, on constate une diminution

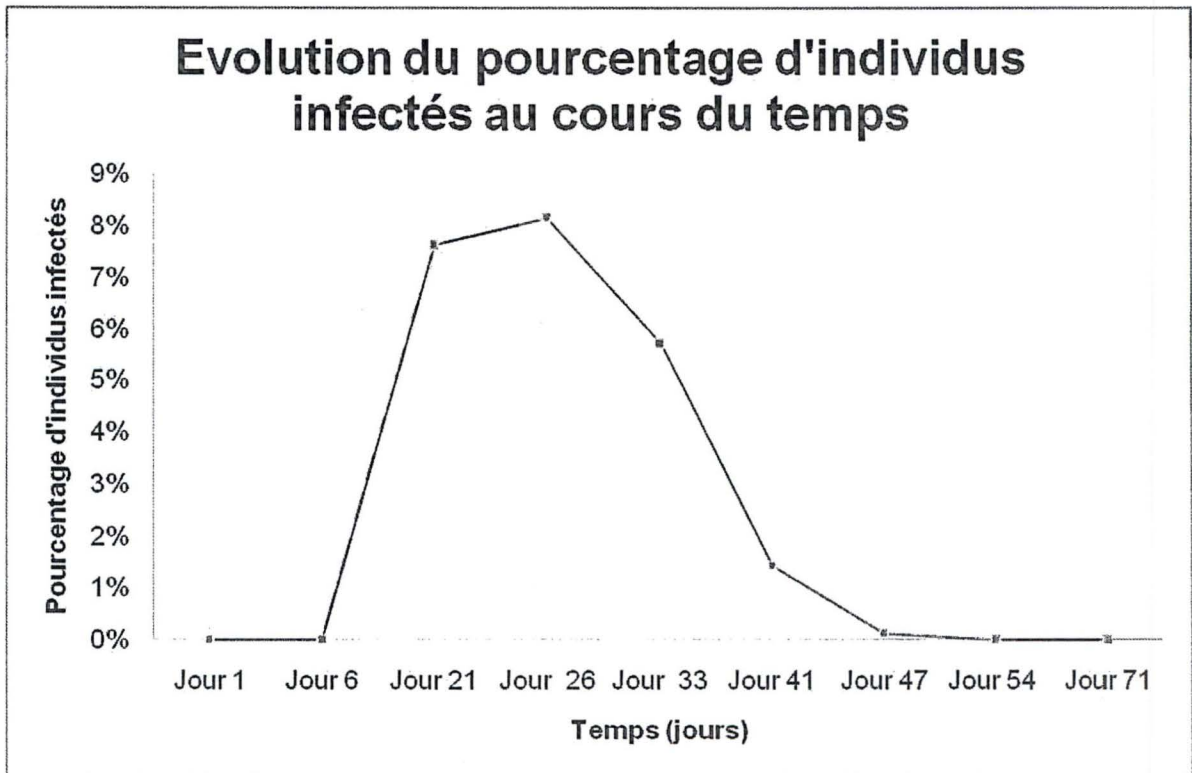


Fig. 26. Evolution du pourcentage d'individus infectés au cours du temps pour le traitement infection.

progressive du rapport jusqu'au 33^{ème} jour à la suite duquel se manifestent de grandes fluctuations très rapides : une augmentation a lieu jusqu'au 41^{ème} jour, puis une brusque diminution au 47^{ème} jour, puis une nouvelle augmentation au 54^{ème} jour, puis une diminution jusqu'au 71^{ème} jour, fin des observations. Il est intéressant de noter que la courbe correspondant au traitement infection est quasi systématiquement plus importante que les courbes observées pour les autres traitements. Dans le cas du **traitement contrôle**, le nombre d'œufs produits par femelle suit un schéma similaire à ce que l'on retrouve dans le cas du traitement infection : il atteint un peu plus de 0,5 au 6^{ème} jour. Par la suite, ce nombre diminue jusqu'au 26^{ème} jour et atteint un pic au 41^{ème} jour et diminue ensuite à nouveau progressivement jusqu'à la fin des observations. On constate néanmoins que le nombre d'œufs produits au cours du temps pour le traitement contrôle est quasi toujours inférieur au nombre d'œufs produits dans le cas du traitement infection. Cependant, les pics se manifestant le 47^{ème} jour se superposent pour les deux traitements.

d.2 Analyse et interprétation des résultats

Les résultats obtenus pour le **traitement famine** suggèrent que les femelles cessent de pondre des œufs lorsque la capacité de soutien du milieu est atteinte. Quant aux résultats obtenus pour le **traitement infection**, ils semblent indiquer que les individus exposés au champignon pondent davantage d'œufs que les individus du **traitement contrôle** et que ceux qui sont rapidement confrontés à la capacité limitée du milieu à accueillir davantage d'individus par manque de ressources nutritives.

e. Evolution du nombre du pourcentage d'individus infectés au cours du temps

e.1 Description des résultats

La **figure 26** représente un graphique qui illustre l'évolution du pourcentage d'**individus infectés** au cours du temps pour le **traitement infection**. On constate une augmentation de la proportion d'individus infectés après le 6^{ème} jour. Un pic d'un peu plus de 8% est atteint au 26^{ème} jour. Par la suite, on observe une diminution progressive de ce pourcentage jusqu'au 54^{ème} jour. Finalement, plus aucun individu infecté n'a été observé.

e.2 Analyse et interprétation des résultats

Il semblerait que durant les 26 premiers jours la virulence soit à son apogée. Par la suite, elle semble décroître progressivement et n'affecte plus les individus. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette décroissance de la virulence. Premièrement, la virulence du champignon pourrait s'atténuer au cours du temps suite aux nettoyages successifs des milieux de cultures, diminuant ainsi les concentrations de spores infectieuses libérées dans le milieu. L'hydratation des spores pourrait également affecter leur virulence. Ensuite, il est également possible que les organismes s'adaptent à l'exposition du parasite. La modification du comportement de certains individus pourrait avoir permis à une partie de la population d'échapper à l'infection. En devenant inactifs, ces individus auraient attendu des conditions plus favorables pour reprendre une activité et se reproduire. Il est possible qu'après le 26^{ème} jour, la concentration en spores infectieuses soit devenue assez faible, suite aux quelques lavages, pour que les organismes puissent survivre et reprendre une activité normale. Cette dernière hypothèse montre que la modification du comportement des Bdelloïdes pourrait constituer une adaptation à un stress parasitaire en permettant à une partie de la population de survivre et de se multiplier une fois le stress passé.

Le pourcentage de 8% estimé au 26^{ème} jour a été calculé sur base de quatre puits : au début de l'expérience, tous les individus présents dans deux des puits sont morts et ces puits n'ont pas été pris en considération dans les analyses. Néanmoins, si ces puits avaient été pris en considération, le pourcentage aurait été nettement plus important.

2) Analyse approfondie des deux composantes du fitness

a. Introduction

La valeur sélective (ou fitness) est un concept central dans la théorie de l'évolution : elle représente la mesure du succès reproducteur et de la survie d'un individu présentant un génotype particulier (Thomas et al., 2007). Dans le but de savoir si les différents traitements ont un impact significatif sur le pourcentage d'individus vivants et le nombre d'œufs produits par femelle, une analyse de la variance (ANOVA II) a été réalisée pour ces deux paramètres. En effet, ces paramètres sont ceux qui reflètent le mieux la survie et la fécondité, les deux composantes nécessaires pour évaluer la valeur sélective d'un individu.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	11	1,182	0,107	3,040	0,006
Résidus	36	1,273	0,035		
Total	47	2,455			

Fig. 27. Tableau d'analyse de la variance

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Traitement	2	0,801	0,401	11,328	0,000
Temps	3	0,116	0,039	1,093	0,365
Traitement*Temps	6	0,265	0,044	1,251	0,304

Fig. 28. Analyse des sommes des carrés

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Famine ~ Infection	0,316	4,756	2,444	< 0,0001	Oui
Famine ~ Contrôle	0,147	2,209	2,444	0,083	Non
Contrôle ~ Infection	0,169	2,547	2,444	0,040	Oui

Fig. 29. Résultats du test de Tuckey

b. Evolution du pourcentage d'individus vivants au cours du temps

b.1 Description des résultats

L'analyse de la variance à 2 facteurs a permis de mettre en évidence un effet du traitement, un effet du temps, ainsi qu'un effet de l'interaction entre le traitement et le temps. Le coefficient de détermination R^2 est de 0,56, ce qui signifie que 56% de la variabilité observée est expliquée par le traitement, le temps et l'interaction entre le temps et le traitement. Le reste de la variabilité est explicable par des effets qui n'ont pas été identifiés au cours de l'expérience et qui font partie de la variabilité résiduelle.

Le test de Fisher (**Fig. 27**) permet de montrer que la probabilité associée au F, c'est-à-dire la P-valeur, est inférieure à 0,05. Cela signifie que le risque de conclure que la variable explicative apporte une quantité d'informations significatives au modèle est quasi nul : les variables traitement et temps, ainsi que leur interaction apportent donc une information significative pour expliquer la variabilité du pourcentage d'individus vivants. En outre, l'analyse des sommes des carrés (type III) (**Fig. 28**) révèle que les F associés au traitement, au temps et à l'interaction entre le traitement et le temps sont supérieurs aux valeurs F théoriques : les variables traitements, temps et interaction entre le traitement et le temps ont toutes un effet significatif sur le pourcentage d'organismes vivants. La somme des carrés la plus élevée est celle qui correspond au traitement : le traitement est donc la variable qui apporte le plus d'informations au modèle.

Un test de Tuckey (**Fig. 29**) montre qu'il existe une différence significative entre les moyennes correspondant au traitement famine et au traitement infection et une différence significative entre les moyennes correspondant au traitement contrôle et le traitement famine. Par contre, aucune différence significative entre les moyennes correspondant au traitement contrôle et au traitement infection n'a pu être montrée. Il n'y a pas non plus de différence significative entre les moyennes correspondant aux différents temps.

b.2 Analyse et interprétation des résultats

Les résultats obtenus montrent que le traitement, le temps et leur interaction ont un effet sur la proportion d'individus vivants. Néanmoins, 56% seulement de la variabilité est expliquée

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	23	5,041	0,219	3,687	< 0,0001
Résidus	72	4,281	0,059		
Total	95	9,322			

Fig. 30. Tableau d'analyse de la variance

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Traitement	2	1,335	0,668	11,229	< 0,0001
Temps	7	2,892	0,413	6,948	< 0,0001
Traitement*Temps	14	0,814	0,058	0,978	0,484

Fig. 31. Analyse des sommes des carrés

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Infection ~ Famine	0,286	4,685	2,393	< 0,0001	Oui
Infection ~ Contrôle	0,180	2,958	2,393	0,012	Oui
Contrôle ~ Famine	0,105	1,728	2,393	0,202	Non

Fig. 32. Résultats du test de Tuckey

par ces différents facteurs : une grande partie de la variabilité observée n'est donc pas expliquée par le modèle. Il est possible que la concentration en spores infectieuses n'ait pas été la même pour tous les répliquats dans le cas du traitement infection (ce qui est difficilement contrôlable). L'évaporation n'a pas toujours été identique pour tous les puits : étrangement, l'eau s'évaporait plus fortement dans certaines boîtes et certains puits par rapport à d'autres malgré une modification régulière de la position des cultures dans l'incubateur. Les lavages et les bactéries rajoutées comme nourriture constituent également des facteurs qui ont pu amener de la variabilité.

Cette absence de différence significative entre les moyennes correspondant aux traitements infection et contrôle s'explique en réalité par l'augmentation du pourcentage d'individus vivants après 33 jours d'observations. En effet, lorsque l'on réalise une analyse de la variance sur les échantillons des jours 6, 21, 26 et 33, le test de Tukey montre qu'il y a bien une différence significative entre les moyennes correspondant au traitement infection et contrôle. Ces résultats montrent donc que l'effet de l'inoculation décline progressivement au cours du temps.

c. Evolution du nombre d'œufs produits par femelle active au cours du temps

c.1 Description des résultats

L'analyse de la variance à 2 facteurs a permis de mettre en évidence un effet du traitement, un effet du temps, ainsi qu'un effet de l'interaction entre le traitement et le temps. Le coefficient de détermination R^2 est de 0,54 : 54% de la variabilité observée est expliquée par le traitement, le temps et leur interaction. Le reste de la variabilité constitue de la variabilité résiduelle.

Le P-valeur est inférieur à 0,001 (**Fig. 30**) : les variables traitement et temps, ainsi que leur interaction apportent donc une information significative pour expliquer la variabilité du nombre d'œufs pondus par femelle. L'analyse des sommes des carrés (type III) (**Fig. 31**) révèle que les F associés au traitement, au temps et à l'interaction entre le traitement et le temps sont supérieurs aux valeurs F théoriques : les variables traitements, temps et interaction entre le traitement et le temps ont toutes un effet significatif sur le nombre d'œufs pondus par

femelle. La somme des carrés la plus élevée est celle qui correspond au temps : le temps est donc la variable qui apporte le plus d'informations au modèle.

Un test de Tukey (Fig. 32) montre qu'il existe une différence significative entre les moyennes correspondant au traitement famine et infection et une différence significative entre les moyennes correspondant au traitement infection et au traitement contrôle. Aucune différence significative n'a cependant pu être montrée entre les moyennes correspondant au traitement famine et au traitement contrôle.

c.2 Analyse et interprétation des résultats

Les résultats de l'analyse montrent que les individus exposés au parasite ont tendance à pondre davantage d'œufs. Les Bdelloïdes semblent donc augmenter leur allocation à la reproduction en produisant davantage de descendants. Cette augmentation de l'investissement à la reproduction par une augmentation de la fécondité est observée chez de nombreux organismes et a été montrée pour la première fois chez les escargots *Biomphalaria glabatra* qui produisent plus d'œufs lorsqu'ils sont exposés au trématode parasite *Schistosoma mansoni* (Thomas et al., 2007).

Par contre, on n'a pas réussi à mettre en évidence une différence significative entre les moyennes correspondant au traitement contrôle et au traitement famine sur la période d'observation. Ce résultat est probablement dû au fait que dans les deux traitements, les organismes atteignent rapidement la capacité de soutien du milieu, ce qui induit d'une part une partie des individus à rentrer dans un état d'inactivité et, d'autre part, une réduction de la fécondité des femelles actives. On aurait pu s'attendre après environ un mois à ce que le nombre d'œufs pondus par femelle active atteigne un niveau aussi bas que dans le cas du traitement contrôle puisque la virulence du parasite s'estompe à ce moment-là. Cela n'est pas observé car les organismes, dans le cas du traitement infection, n'ont probablement pas atteint la capacité limite de soutien du milieu et les femelles ont continué dès lors à pondre des œufs.

3) Evaluation de l'hypothèse d'adaptation

Dans le but de savoir si la diminution du pourcentage d'individus infectés observée après 26 jours (Fig. 25) résulte d'une diminution de la virulence du champignon ou d'une

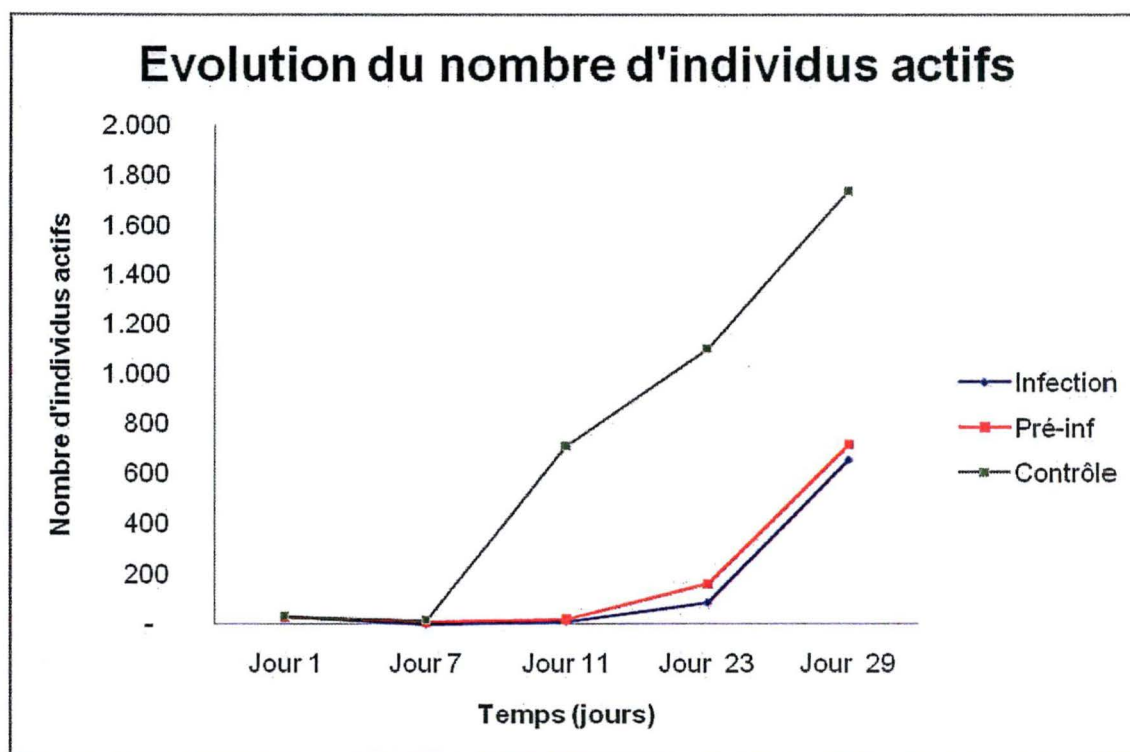


Fig. 33. Evolution du nombre d'individus actifs au cours du temps.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	11	10729046,864	975367,897	43,534	< 0,0001
Résidus	48	1075422,018	22404,625		
Total	59	11804468,881			

Fig. 34. Tableau d'analyse de la variance

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Traitement	2	3695105,407	1847552,704	82,463	< 0,0001
Temps	3	5327616,968	1775872,323	79,264	< 0,0001
Traitement*Temps	6	1706324,488	284387,415	12,693	< 0,0001

Fig. 35. Analyse des sommes des carrés

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
Contrôle ~ Infection	544,774	11,509	2,418	< 0,0001	Oui
Contrôle ~ Pré-inf	505,944	10,689	2,418	< 0,0001	Oui
Pré-inf ~ Infection	38,830	0,820	2,418	0,692	Non

Fig. 36. Résultats du test de Tuckey

acclimatation progressive des rotifères, des individus actifs issus du **traitement infection** ont été répartis à raison de 30 individus par puits sur une nouvelle plaque comportant du champignon « frais » (**traitement « pré-infection »**). Parallèlement, des individus issus du traitement contrôle ont été répartis à raison de 30 individus par puits sur une plaque comportant du champignon « frais » (**traitement infection**) et sur une plaque comportant uniquement du CMA (**traitement contrôle**). Les populations de ce deuxième jeu d'expérience ont été suivies durant un mois.

Le nombre d'individus actifs augmente plus rapidement dans le cas du **traitement contrôle** (**Fig. 33**). L'évolution du nombre d'individus actifs est assez similaire entre le **traitement infection** et le **traitement « pré-infection »** : le nombre d'individus actifs dans le cas de ce dernier traitement semble croître plus rapidement. L'analyse de la variance a permis de mettre en évidence un effet du traitement et un effet du temps, ainsi qu'un effet de l'interaction entre le temps et le traitement (**Fig. 34**). L'analyse des sommes des carrés (type III) (**Fig. 35**) révèle que les F associés au traitement, au temps et à l'interaction entre le traitement et le temps sont supérieurs aux valeurs F théoriques : les variables traitements, temps et interaction entre le traitement et le temps ont toutes un effet significatif sur le nombre d'individus actifs. Le test de comparaison multiple de Tuckey (**Fig. 36**) montre qu'il existe une différence significative entre la moyenne correspondant au contrôle et les moyennes correspondant aux deux autres traitements. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre la moyenne correspondant au traitement infecté et « pré-infecté ».

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence l'existence d'une acclimatation de la part des Bdelloïdes. Cela ne veut pas dire qu'elle n'existe pas. Néanmoins, ces résultats semblent montrer que la diminution du pourcentage d'individus infectés observé après le 26^{ème} jour dans la première expérience sera davantage due à une atténuation de la virulence des spores. On sait que les conidiophores et les conidies ne sont jamais produits sous l'eau contrairement aux aleuriospores, les spores de persistance (Barron, 1985 ; Barron, 1991). Il est donc probable qu'une fois hydraté, le champignon ait stoppé la production de conidies, les spores infectieuses. Quand aux conidies libérées dans l'eau juste après l'hydratation, il est fort possible que leur virulence diminue lorsqu'elles sont hydratées et qu'une partie d'entre elles ait été éliminée à la suite des lavages. Néanmoins, l'utilisation de tables de survies permettrait de vérifier de manière plus adéquate l'existence ou pas d'une acclimatation.

4) Synthèses des observations : réactions de défense face au parasitisme

Les observations montrent que le champignon provoque une modification du comportement des Bdelloïdes. En modifiant leur morphologie et en rentrant dans un état d'inactivité apparente, ces animaux limiteraient l'entrée de spores infectieuses au niveau de leur tube digestif. Cela permet d'expliquer pourquoi tous les individus ne meurent pas au début de l'expérience. Après environ un mois, le champignon semble ne plus affecter les organismes. Une acclimatation de la part des Bdelloïdes n'a pu être montrée de manière significative. Il est donc fort possible que le champignon cesse de produire des conidies lorsqu'il est hydraté. Quant aux conidies qui sont libérées lors de l'hydratation, leur virulence semble s'atténuer. Si cette hypothèse s'avère correcte, cela montre que le repliement qu'adoptent les Bdelloïdes face à un parasite constitue une adaptation car il permet à une partie de la population d'échapper au parasite et de reprendre une activité lorsque les conditions environnementales sont plus favorables. Les Bdelloïdes sont très abondants au niveau du sol et des mousses où les conditions environnementales peuvent changer très rapidement. Il est donc possible que dans la nature ils modifient leur comportement face à un parasite et attendent des conditions plus propices pour reprendre une activité telles que des périodes de pluies qui pourraient affecter négativement les champignons parasites, qui, une fois hydratés, cessent de produire des spores infectieuses.

Outre les modifications comportementales, une autre façon de réduire les effets négatifs du parasitisme sans vraiment s'opposer à celui-ci consiste à modifier les traits d'histoire de vie (Thomas et al., 2007). Un des exemples d'ajustement des traits d'histoire de vie consiste à augmenter l'effort reproducteur, ce qui peut se traduire par une augmentation de la production de descendants. Dans le cas du traitement infection, les résultats semblent indiquer que les individus exposés au champignon, lorsqu'ils sont actifs, pondent davantage d'œufs que les individus non-stressés (traitement contrôle) ou qui sont soumis à une absence de nourriture (stress famine). La mise en place de mécanismes d'ajustement à la reproduction est un aspect souvent étudié dans les recherches portant sur les relations hôte-parasite. L'augmentation de l'investissement précoce à la reproduction par une augmentation de la fécondité, juste après l'exposition du parasite, a été observée sur de nombreux couples hôte-parasite (Thomas et al., 2007). Cela semble le cas ici. Néanmoins, la réalisation de tables de survie permettrait

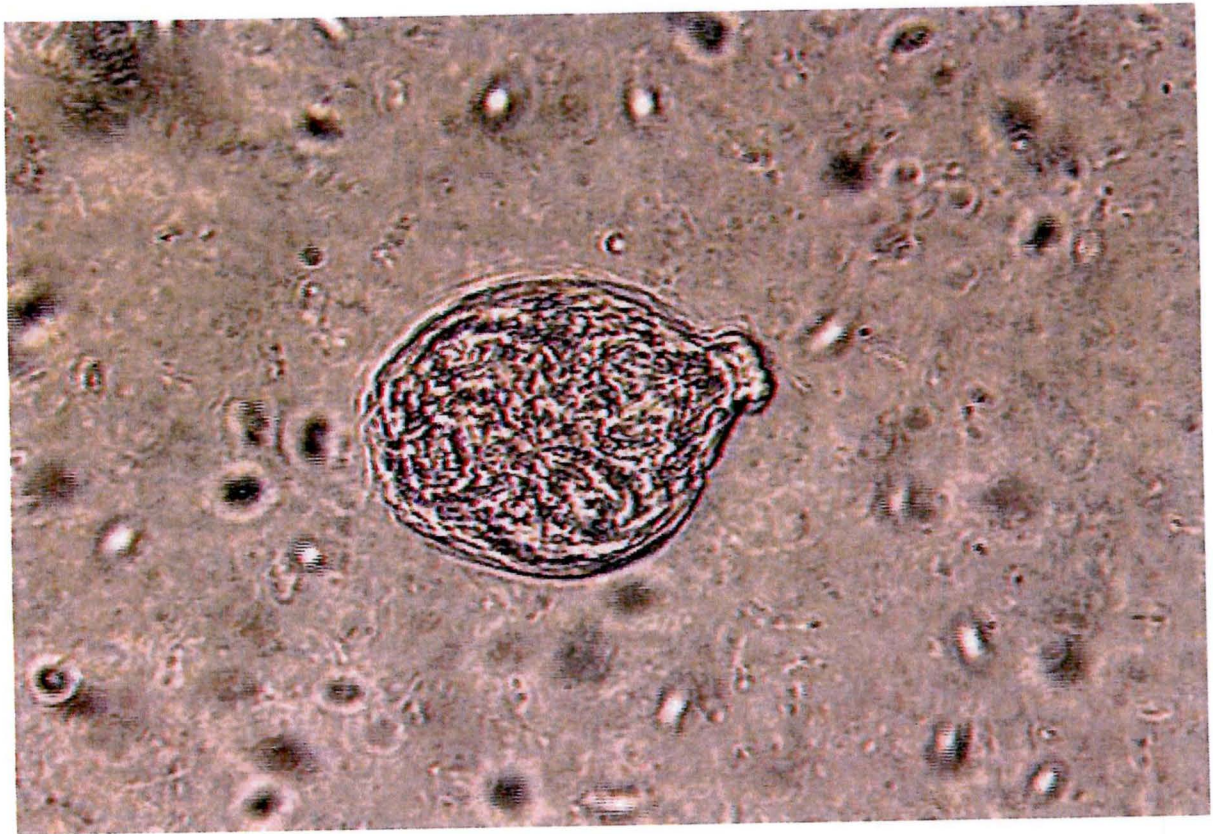


Fig. 37. *Adineta vaga*. Microscopie photonique. Forme prise par les individus exposés au parasite fongique *Rotiferophthora angustispora*.

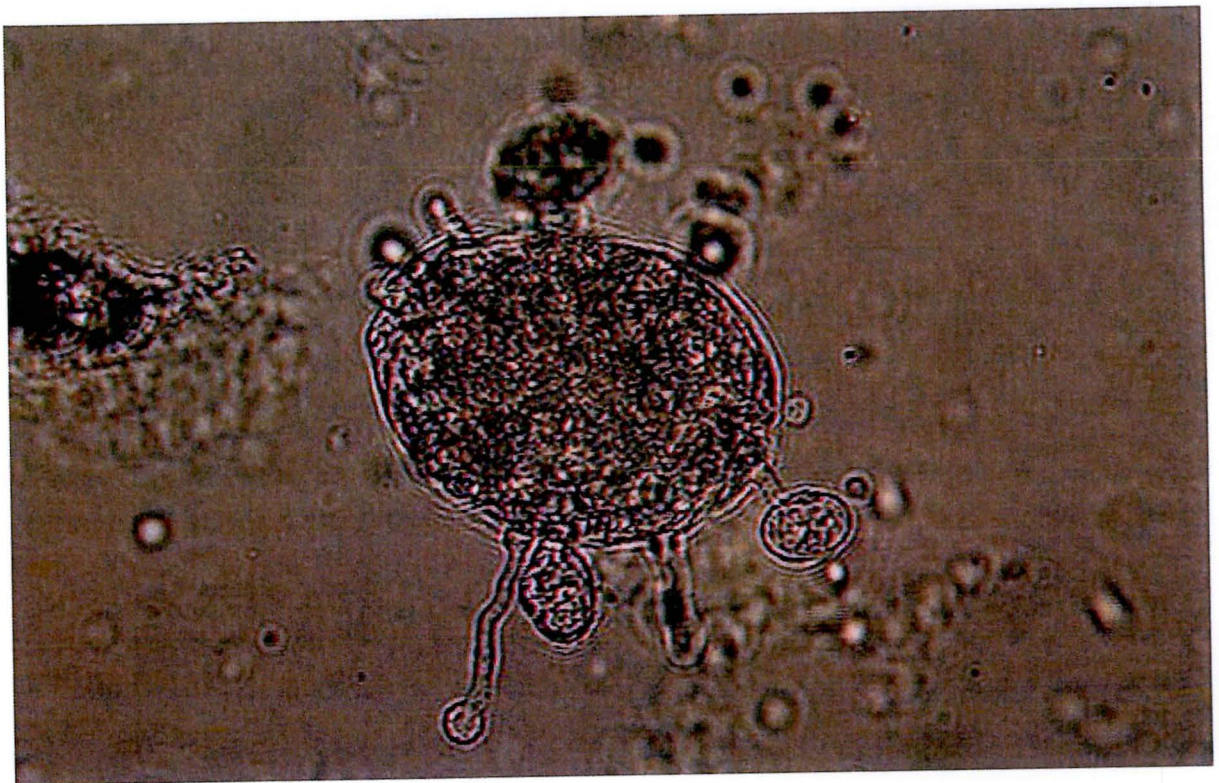


Fig. 38. *Adineta vaga*. Microscopie photonique. Individu infecté par *Rotiferophthora angustispora*. Une fois infectés, les individus prennent une teinte foncée et des hyphes sortent de l'organisme. Les spores produites semblent être des aleuriospores, spores non infectieuses de persistance.

d'approfondir cette question car les analyses statistiques réalisées dans le présent travail montrent l'intervention d'une grande part de variabilité résiduelle.

III. Réponse morphologique à différents stress

1) Utilisation de la microscopie photonique

Parallèlement au suivi des populations soumises aux différents traitements de stress au cours du temps, l'utilisation de la microscopie photonique a permis de visualiser la forme générale prise par l'espèce *Adineta vaga* face au parasite et à un manque prolongé de nourriture. Les individus exposés au champignon parasite manifestent une modification morphologique en moins de 48 heures : les individus cessent de se mouvoir et adoptent un repliement qui leur permettrait peut-être d'échapper au parasite (**Fig. 37**). Un prélèvement de six individus ayant adopté cette forme de repliement et transférés dans un milieu dépourvu du parasite a permis de montrer une reprise d'activité rapide de ces individus. Ce repliement pourrait être un comportement que les Bdelloïdes adoptent afin d'éviter d'être parasités et d'attendre des conditions plus favorables. Néanmoins, nombreux sont les individus qui, les premières semaines, adoptent cette forme en boule et manifestent par la suite des signes d'infection. Après une semaine environ, les individus infectés présentent une couleur noire et des hyphes commencent à sortir de leur corps (**Fig. 38**). Le repliement de l'animal est tel qu'il n'est pas possible de connaître l'endroit exact où s'initie l'infection. Néanmoins, on observe au niveau de la **figure 39** une masse foncée à l'intérieur de l'organisme infecté, masse qui se situe dans l'axe du tube digestif et représente probablement une masse d'hyphes. Cette constatation confirme des observations déjà réalisées dans le passé (Barron, 1985 ; Barron, 1991) selon lesquelles les Bdelloïdes ne sont infectés qu'après l'ingestion de spores infectieuses qui se développent d'abord au niveau du système digestif avant de s'étendre dans le reste du corps. Sur les **figures 38 et 39**, on remarque que les hyphes présentent des extrémités arrondies qui sont probablement des aleuriospores, spores de persistance non infectieuses produites lorsque *Rotiferophthora angustispora* est immergé (Barron, 1985 ; Barron, 1991). Cette observation supporte l'hypothèse selon laquelle le champignon cesse de produire des spores infectieuses (les conidies).

Les individus soumis à un manque de nourriture prolongé sont caractérisés par un repliement très similaire à celui que l'on observe dans le cas d'individus stressés suite à leur

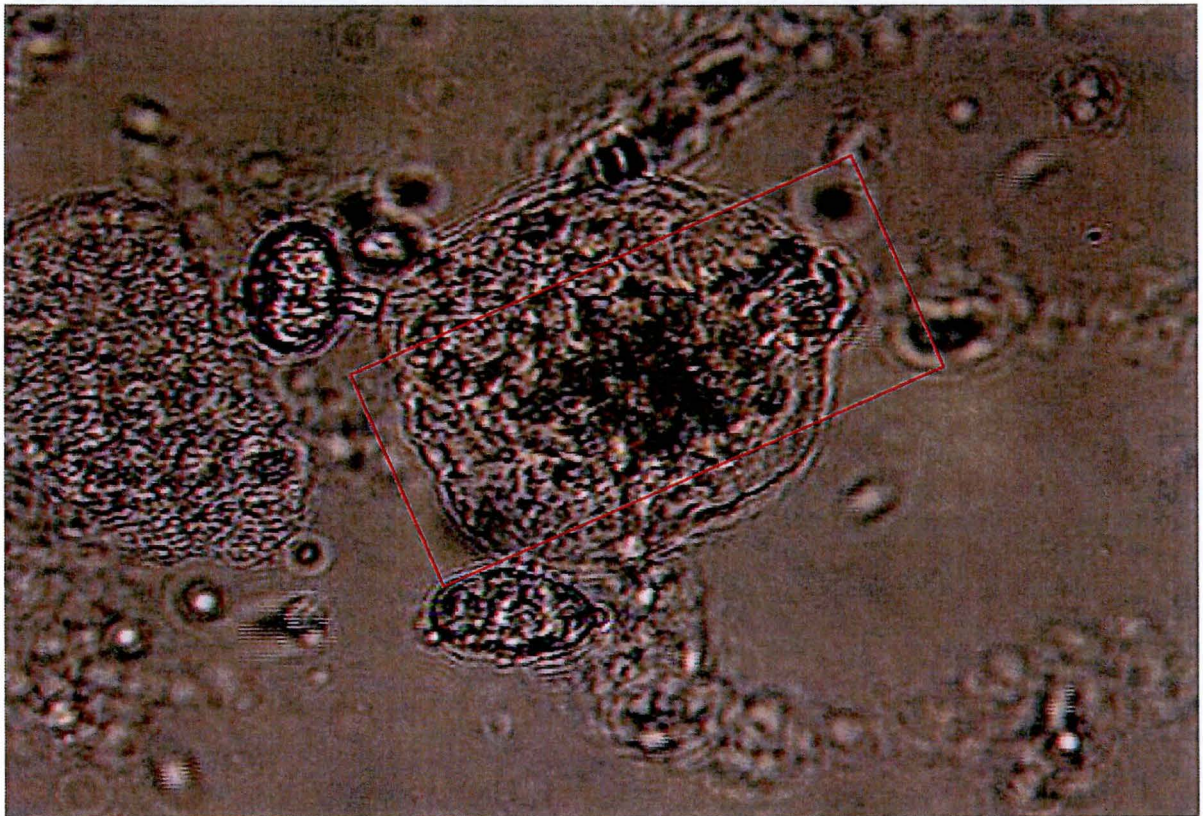


Fig. 39. *Adineta vaga*. Microscopie photonique. Individu infecté par *Rotiferophthora angustispora*. On distingue, encadré en rouge, une masse de teinte foncée située dans l'axe du tube digestif qui constitue probablement une masse d'hyphes qui s'est développée après l'ingestion d'une spore infectieuse (conidie).

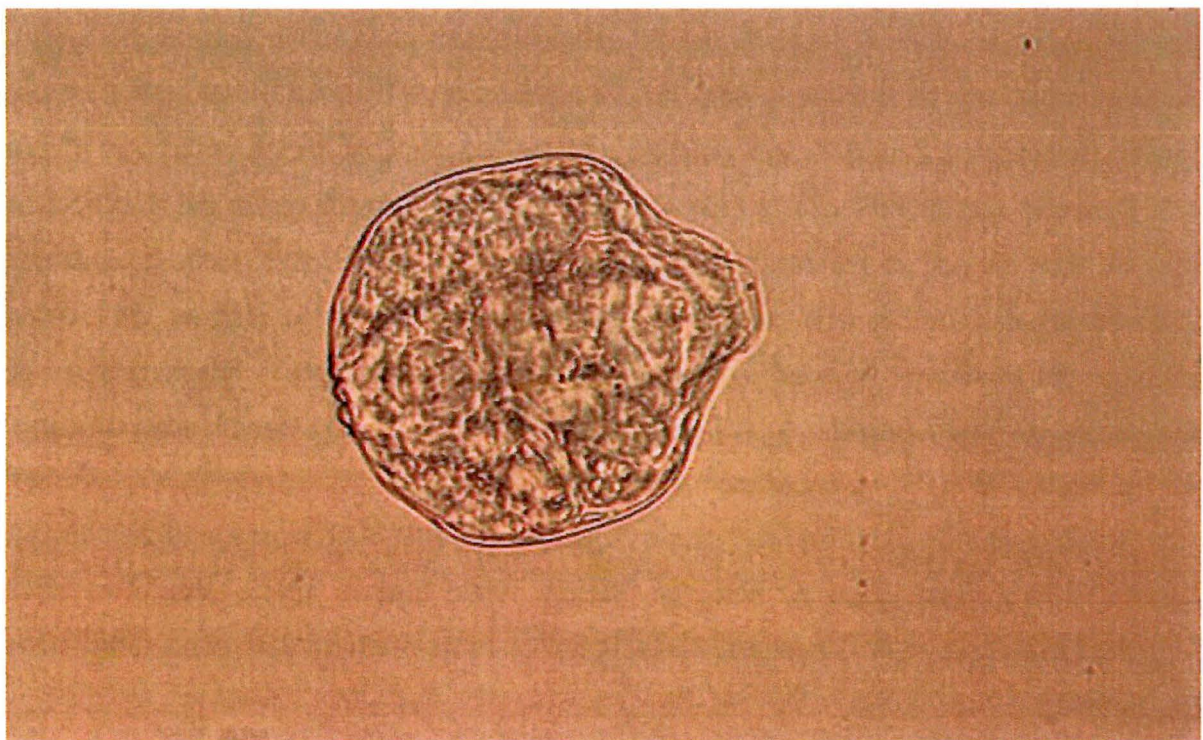


Fig. 40. *Adineta vaga*. Microscopie photonique. Individu stressé à la suite d'un manque de nourriture prolongé.

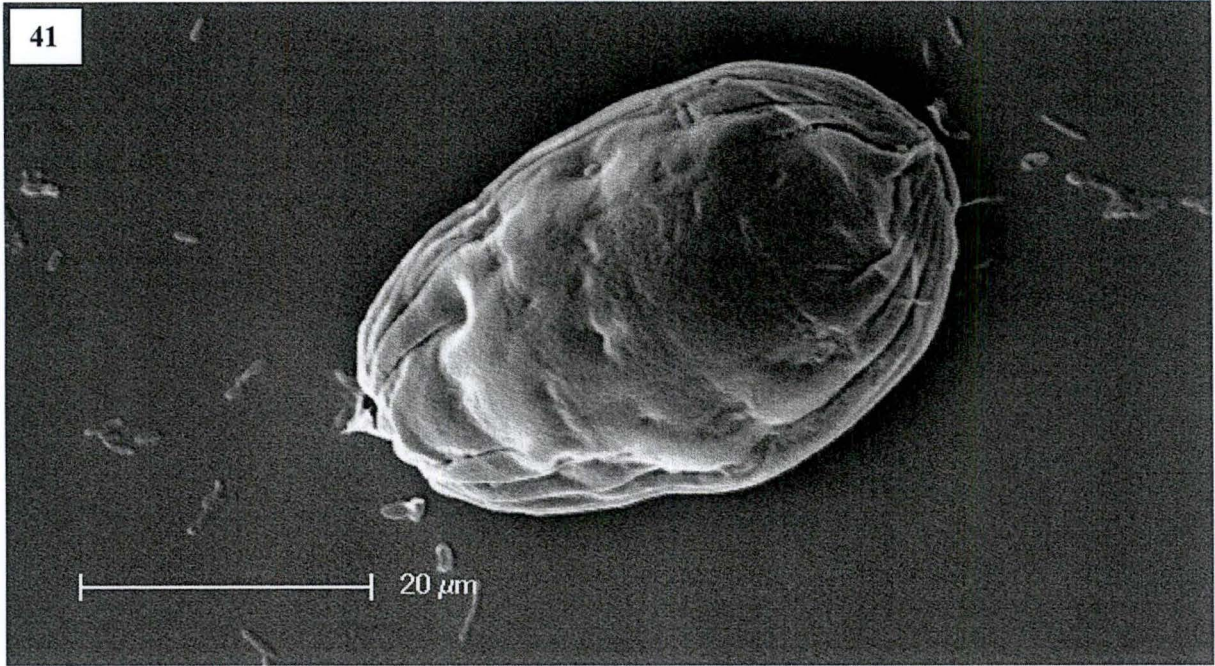


Figure. 41-42. Fig. 41. *Adineta vaga*. MEB. Vue dorsale d'*Adineta vaga* dessiqué sur du LMP 3%. Fig. 42. *Adineta vaga*. MEB. Vue ventrale.

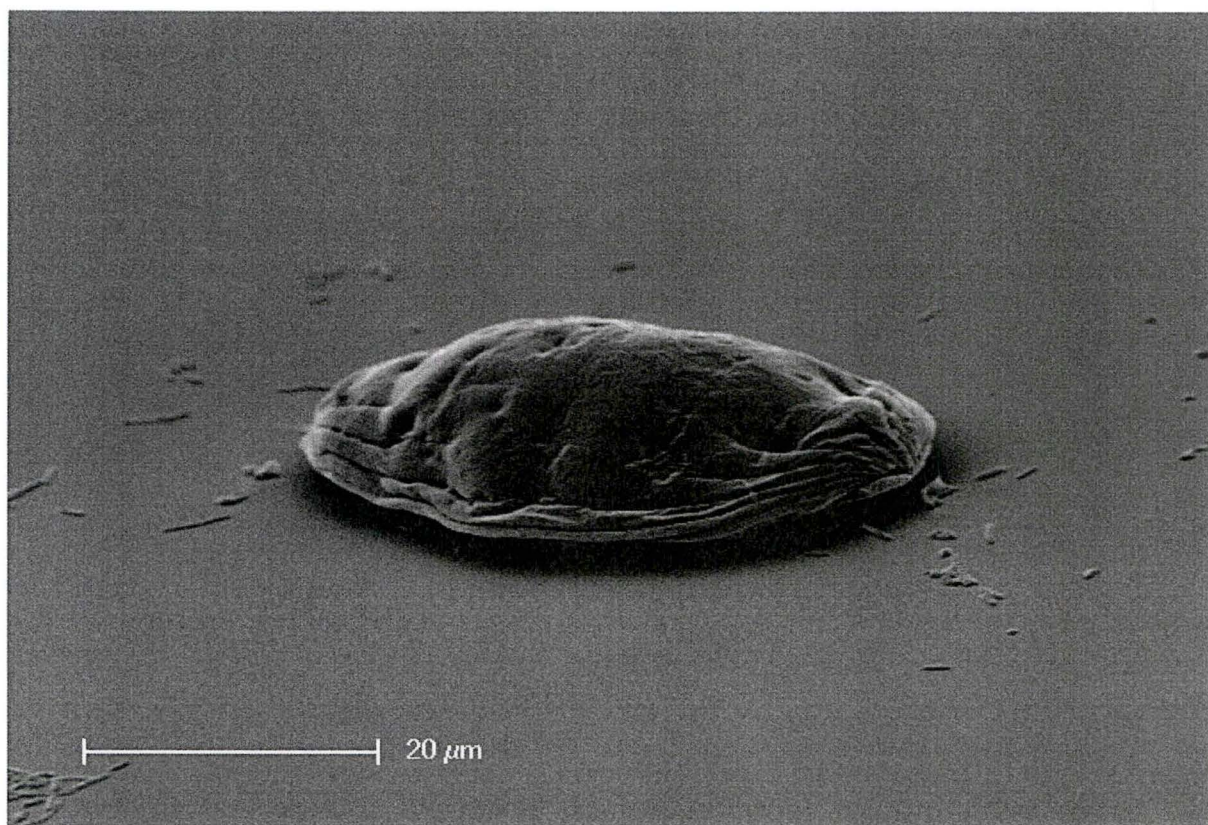


Figure. 43. *Adineta vaga*. MEB. Vue latérale d'*Adineta vaga* dessiqué sur du LMP 3%.

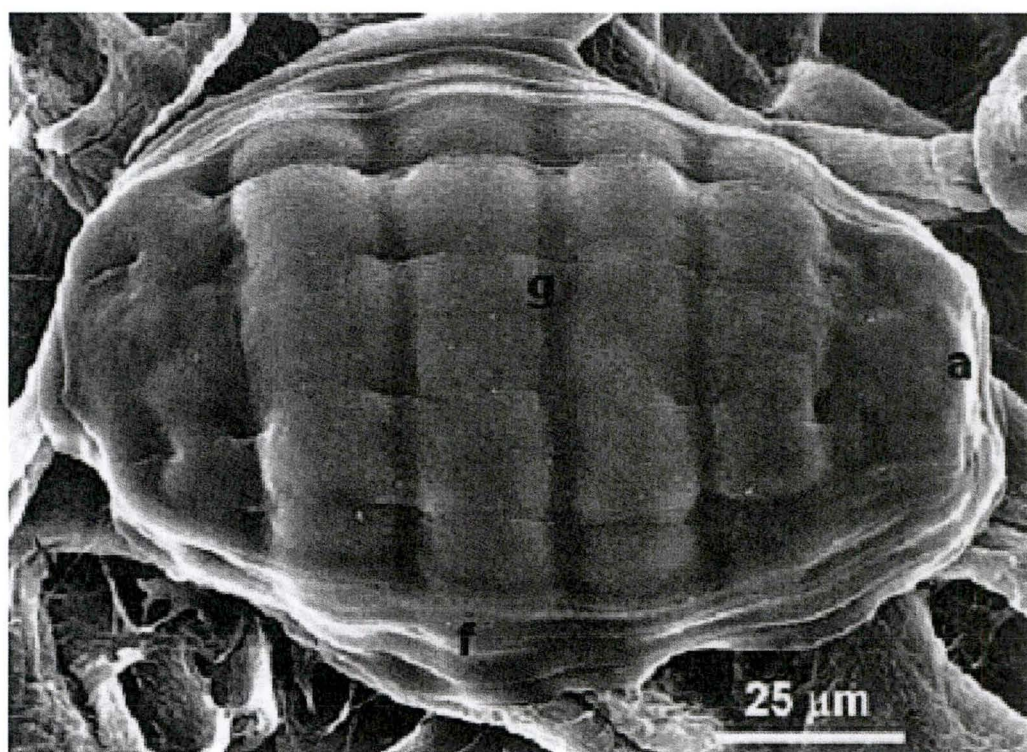


Fig. 44. *Macrotrachela quadricornifera*. MEB. Vue dorsale d'une forme dessiquée. (D'après Ricci et al., 2007).

exposition à un parasite (**Fig. 40**). On observe une immobilisation des individus, ainsi qu'une rétraction du pied et de la tête. Les individus s'isolent ainsi de leur milieu et rentrent dans un état d'inactivité apparente. Des observations au microscope ont cependant montré que les individus qui adoptent une telle forme manifestent une activité interne. De plus, ils sont capables de quitter cet état d'inactivité apparente lorsqu'ils sont transférés dans un autre milieu.

Ces observations suggèrent que le repliement pourrait constituer pour les Bdelloïdes une stratégie d'évitement d'un parasite. De plus, la manière de se replier qu'adoptent les animaux face à un stress parasitaire semble être analogue au mode de repliement adopté par des individus soumis à un manque de nourriture. Néanmoins, pour observer les détails de ces modifications morphologiques, des observations ont été réalisées en microscopie électronique à balayage.

2) Utilisation de la microscopie électronique à balayage

a. Réponse morphologique à la dessiccation

Les observations réalisées en microscopie électronique montrent que les organismes rentrés en dessiccation rétractent la tête et le pied à l'intérieur du tronc qui devient la seule partie visible du corps (**Fig. 41**). La surface dorsale est lisse, pourvue de légères cannelures transversales. Par contre, la partie ventrale est plutôt lisse aussi, mais dépourvue des nombreux plis observés au niveau dorsal (**Fig. 42**). Les organismes présentent de multiples plis longitudinaux sur les côtés (**Fig. 43**). Quant aux extrémités, elles sont légèrement plissées et forment des obturations, isolant l'animal de son milieu extérieur.

La morphologie d'*Adineta vaga* dessiqué est similaire à des résultats obtenus pour *Macrotrachela quadricornifera* (**Fig. 44**) publiés dans plusieurs études (Ricci et al., 2003 ; Ricci et al., 2007). Cependant, les résultats obtenus pour *Adineta vaga* ont été acquis en suivant un mode opératoire différent de ceux utilisé par l'équipe de Claudia Ricci : la dessiccation a été provoquée en plaçant les organismes sur du LMP 3% dans une fine couche d'eau à température ambiante. Le LMP a la particularité d'absorber l'eau très lentement, permettant théoriquement aux organismes de se replier de façon optimale. Néanmoins, le

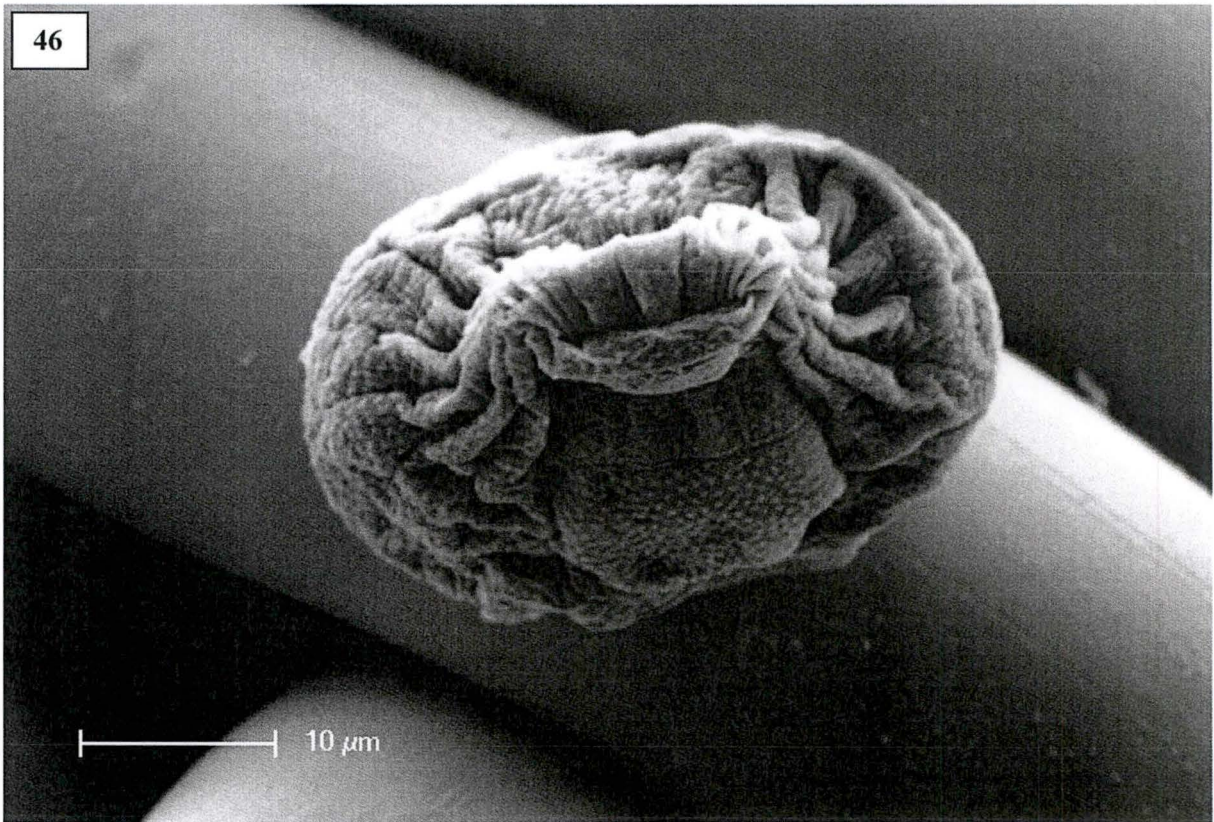
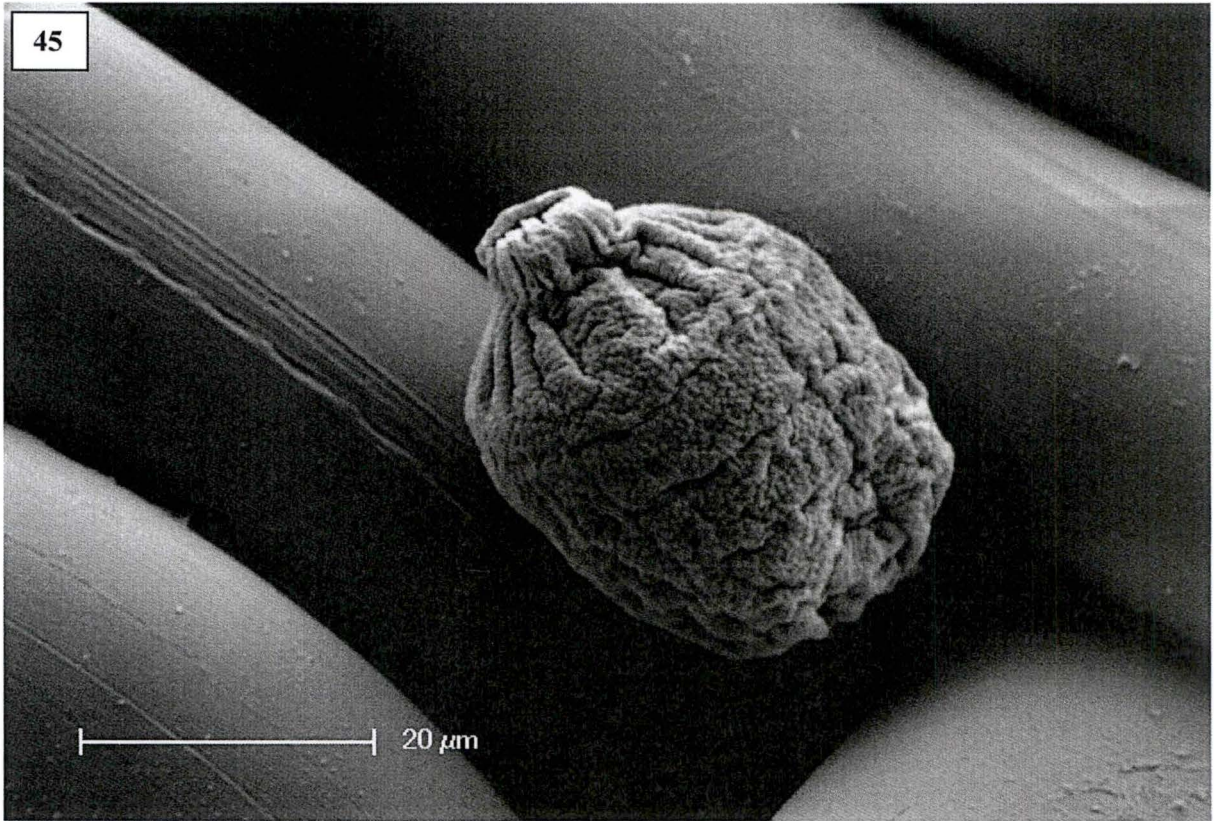


Figure. 45-46. Fig. 45. *Adineta vaga*. MEB. Forme stressée suite à un manque prolongé de nourriture. Fig. 46. *Adineta vaga*. MEB. Vue de la partie antérieure d'une forme stressée suite à un manque prolongé de nourriture.

taux de recouvrement a été estimé de 40% et il est donc probable que certains organismes ne se sont pas repliés de manière adéquate lors de l'entrée en dessiccation.

b. Réponse morphologique liée à un manque de nourriture prolongé

Les individus stressés par un manque de nourriture prolongé sont également contractés, la tête et le pied rétractés à l'intérieur du tronc (**Figs. 45-46**). Le corps a l'apparence d'un cylindre rugueux, tapissé de plis longitudinaux et transversaux. Contrairement aux formes dessiquées, on n'observe pas d'aplatissement dorso-ventral. Quant aux extrémités, elles sont plissées et la plupart du temps repliées, isolant ainsi l'animal du milieu extérieur. Néanmoins, on remarque dans le cas présent un repliement des extrémités moins important que dans le cas des formes dessiquées.

Les individus exposés à un manque de nourriture prolongé manifestent un repliement similaire à celui observé chez les formes dessiquées sur des lames de verres (qui ne survivent pas après la dessiccation) selon le protocole développé par l'équipe de Claudia Ricci (Ricci et al., 2003).

c. Réponse morphologique liée à l'exposition d'un parasite

Les organismes stressés à la suite d'une exposition au champignon parasite sont également contractés (**Figs. 47-48**). Comme dans le cas des formes dessiquées et stressées par un manque de nourriture, on constate une rétraction de la tête et du pied à l'intérieur du tronc. Le corps présente l'apparence d'un cylindre pourvu de légers plis longitudinaux et transversaux. Ici encore, on n'observe pas d'aplatissement dorso-ventral. Les extrémités sont également plissées et repliées, isolant encore l'animal de son milieu. Cependant, le repliement des extrémités semble être moins important que dans le cas des organismes dessiqués, mais plus conséquent que celui observé dans le cas des individus soumis à un manque de nourriture prolongé. En outre, les plis longitudinaux et transversaux sont de moindre importance dans le cas des organismes exposés au parasite que dans le cas des individus stressés par un manque de nourriture prolongé.

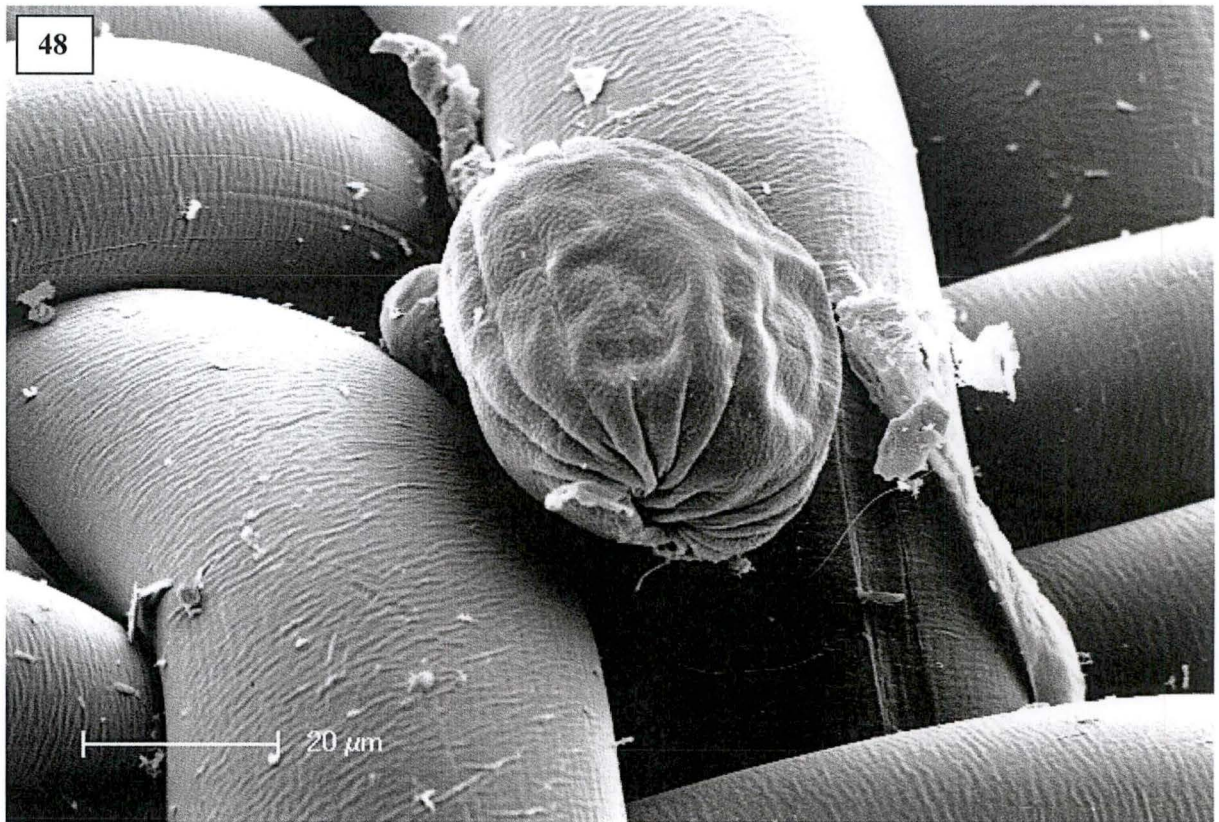
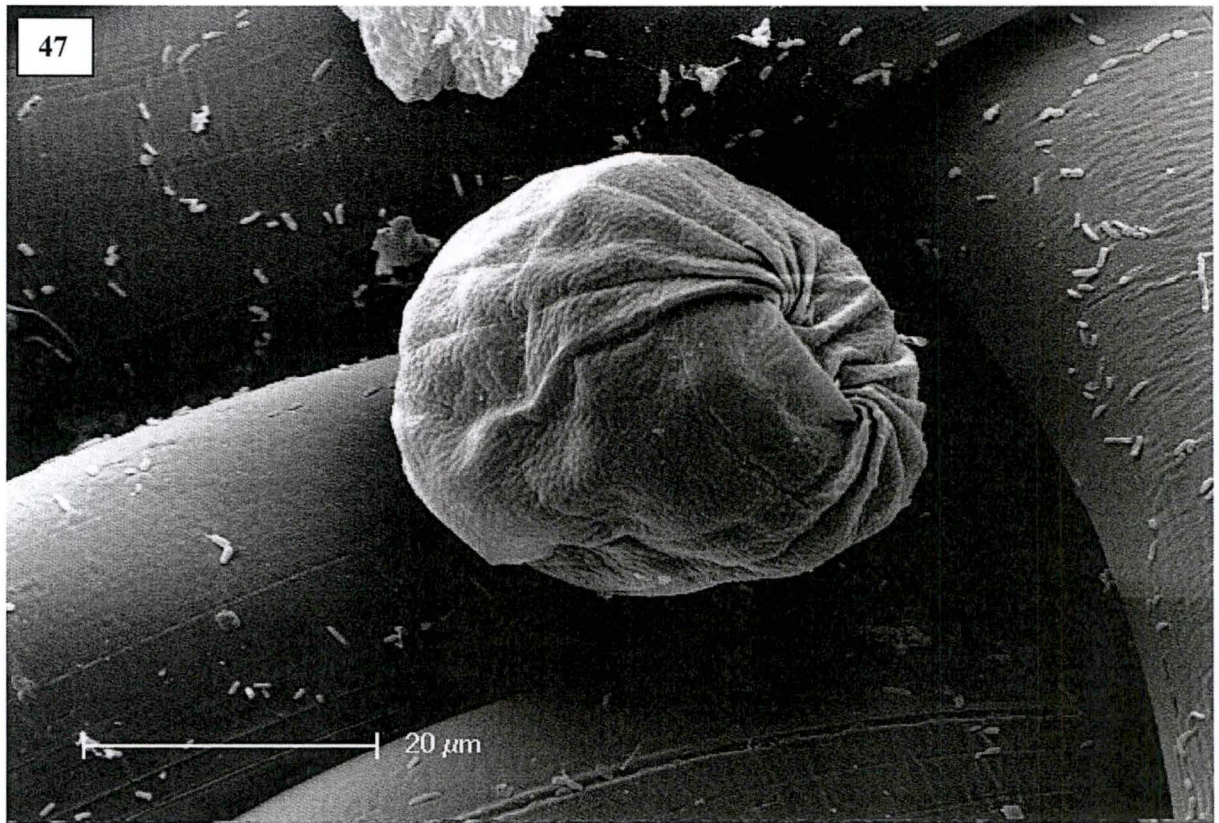


Figure. 47-48. *Adineta vaga*. MEB. Formes stressées suite à l'exposition au parasite fongique *Rotiferophthora angustispora*.

d. Comparaison des trois types de réponses morphologiques

La rétraction de la tête et du pied est une réponse habituellement observée chez les Bdelloïdes à la suite de perturbations dans la nature. Ce comportement réduit la surface des téguments exposés et constitue donc probablement une réaction de défense contre des conditions environnementales défavorables (Ricci et al., 2003). Dans notre cas, les Bdelloïdes ont été exposés à trois types de perturbations : une perturbation chimique (le manque de nourriture), une perturbation physique (la dessiccation) et une perturbation biologique (l'exposition à un parasite). La comparaison des différences relatives aux changements morphologiques adoptés par les individus soumis à ces différents stress permet de faire un certain nombre de constatations intéressantes.

Comme on pouvait s'y attendre, les organismes dessiqués manifestent les changements morphologiques les plus importants. Les plus remarquables de ces changements sont l'aplatissement dorso-ventral extrême, ainsi que le repliement des extrémités. Cette importante contraction du corps permettrait aux Bdelloïdes de contrôler les taux conséquents de pertes d'eau provoquées par l'évaporation du corps en réduisant leur surface et en diminuant le rapport surface/volume (Ricci et al., 2003). La comparaison des photos obtenues par microscopie électronique à balayage et la littérature montrent que le LMP (Low Melting Point) constitue un support acceptable pour étudier la dessiccation puisque de nombreux organismes présentent un aspect très similaire à ce que l'on peut voir dans la littérature. Néanmoins, le taux de recouvrement atteint 40%, ce qui signifie qu'une partie des animaux ne survit pas à la dessiccation. Il aurait peut-être été plus adéquat de réaliser les expériences relatives à la dessiccation en suivant le protocole D développé par l'équipe du Professeur Ricci (Ricci et al., 2003). Malheureusement, ce protocole nécessite l'utilisation d'une chambre de croissance permettant de contrôler la température et l'humidité, indisponible au laboratoire. Ce matériel est indispensable lorsque l'on veut contrôler et optimiser la mise en place du processus de dessiccation. En effet, des études ont montré que l'évolution des conditions de température et d'humidité relative avait un impact majeur sur l'entrée en dessiccation et la mortalité des individus après réhydratation (Caprioli et Ricci, 2001 ; Ricci et al., 2003). En outre, la durée de la période d'anhydrobiose est également connue pour affecter la viabilité des organismes. On observe par exemple chez l'espèce *Macrotrachela quadricornifera* un pourcentage nul d'individus recouverts après une période de sécheresse de 60 jours (Caprioli et Ricci, 2001). A cela s'ajoute le fait que la capacité de recouvrement varie

entre les espèces (Caprioli et Ricci, 2001 ; Ricci, 1998). La complexité du processus de dessiccation nécessite donc un contrôle optimal en laboratoire des conditions dans lesquelles il doit se dérouler.

Les individus soumis à un stress chimique, c'est-à-dire l'absence prolongée de nourriture, arborent un degré de contraction moins important. Mais très curieusement, leur morphologie est très similaire à la morphologie observée chez des individus de l'espèce *Macrotrachela quadricornifera* desséchés sur des lames de verre à une humidité relative de 40% selon le protocole A détaillé par Claudia Ricci et al. (2003). Il est donc fort possible que cet état de contraction observé constitue une des étapes du repliement impliqué dans l'entrée en dessiccation que l'organisme n'a pas le temps de poursuivre étant donné une évaporation excessivement rapide sur les lames de verre. En l'absence d'eau, cet état de contraction ne pourrait donc être viable. Par contre, en la présence d'eau, mais en l'absence de nourriture, cet état serait suffisant aux organismes pour survivre jusqu'à l'apparition de conditions plus favorables. L'absence de nourriture constitue moins un stress à long terme que la dessiccation car elle est étroitement liée à la densité de population. Or, quand des individus meurent, les ressources deviennent rapidement disponibles pour les individus restés en « stand-by » qui, rapidement, manifestent une reprise d'activité.

Les individus soumis à un stress biologique, c'est-à-dire exposés à un parasite, se caractérisent par une contraction moins importante que lors d'une dessiccation, ou même d'une exposition à une absence prolongée de nourriture. Les individus stressés par un parasite présentent moins de replis et sont caractérisés par un repliement similaire au repliement qu'adopte l'espèce *Macrotrachela quadricornifera* lorsqu'elle est touchée par un tip (décrit par Ricci et al. (2007)). Le repliement d'*Adineta vaga* exposée au parasite *Rotiferophthora angustispora* pourrait être provoqué par contact avec les hyphes.

Tous ces résultats liés aux changements morphologiques mis en place par *Adineta vaga* face à différents stress suggèrent que les mécanismes sous-jacents sont les mêmes, mais le degré auquel il s'effectue différerait peut-être selon le type et la durée de mise en place du stress. En effet, un contact avec le champignon parasite, qui constitue un stress immédiat, provoque un repliement rapide avec peu de replis. Par contre, le repliement dû à un manque prolongé de nourriture a le temps de se mettre en place. Quant au repliement impliqué lors de la dessiccation, nous avons vu qu'il n'avait lieu de manière optimale que si les organismes avaient le temps de se replier : les individus exposés à une sécheresse intense trop rapidement

n'ont pas le temps de se replier de manière optimale et ne survivent pas après hydratation (Ricci et al., 2003).

Malgré ces hypothèses, beaucoup de questions restent en suspens. Il conviendrait par exemple de savoir si le stress provoqué par le champignon résulte d'un contact physique ou chimique. Il serait également intéressant de connaître les conditions optimales qui permettent à *Adineta vaga* de rentrer en dessiccation. Des expériences ont déjà été conduites avec *Macrotrachela quadricornifera* appartenant à la famille des Philodinidae et des résultats sont donc disponibles pour cette espèce (Ricci et al., 2003). Mais qu'en est-il pour *Adineta vaga* qui appartient à la famille des Adinetidae ? Les patterns d'entrée en dessiccation sont-ils identiques et généralisables pour l'ensemble des espèces de Bdelloïdes ? Ce sont des questions qui, me semble-t-il, mériteraient d'être travaillées car il est délicat de généraliser des observations réalisées sur une seule espèce de Bdelloïdes.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact à court terme du parasitisme induit par le champignon *Rotiferophthora angustispora* sur l'espèce de Bdelloïde *Adineta vaga*. Les observations montrent que le champignon induit une modification comportementale des Bdelloïdes qui changent leur morphologie et entrent dans un état d'inactivité. Les analyses en microscopie électronique à balayage ont par ailleurs montré que la façon de se replier différait en fonction du stress auquel les Bdelloïdes étaient exposés. La rétraction de la tête et du pied à l'intérieur du tronc permet à ces organismes d'éviter d'être infectés par des conidies. Dans la nature, ce repliement permettrait à une partie des populations d'échapper au parasite pour reprendre une activité lorsque les conditions environnementales sont devenues plus favorables. En outre, il paraît indéniable que le mode de vie anhydrobiotique des Bdelloïdes a contribué à leur succès évolutif et il est très probable que leur faculté à rentrer en anhydrobiose leur permet d'échapper à des compétiteurs, des prédateurs et des parasites sensibles, eux, à la dessiccation.

Les résultats semblent indiquer que les Bdelloïdes ajustent leurs traits d'histoire de vie lorsqu'ils sont exposés au parasite en produisant plus d'œufs par femelle. Néanmoins, les analyses statistiques ont montré que l'expérience relative au suivi de l'évolution de populations initiales comportant 30 individus face à différents traitements comportait une grande part de variabilité résiduelle et les résultats sont donc à prendre avec la plus grande prudence. Afin d'améliorer ce genre d'étude, la réalisation de tables de survie sont nécessaires. Elles permettraient notamment d'estimer le nombre d'œufs total pondus par femelle, l'âge de la femelle à la première reproduction ou encore l'âge auquel meurent les femelles. Dans les études des relations hôte-parasite, la survie des juvéniles ou la fécondité adulte sont souvent appréhendées par la taille (Thomas et al., 2007) qui constitue un bon indice de leur qualité. On sait également que les rotifères inféodés à des milieux aquatiques pondent davantage d'œufs de petite taille, tandis que les rotifères inféodés à des milieux terrestres pondent de gros œufs en faible quantité (Ricci et Fascio, 1995), ce qui laisse penser que la taille des œufs pourrait ainsi dépendre des pressions sélectives exercées en fonction du type de milieu. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer la taille des œufs pondus par des individus exposés à un parasite avec les œufs pondus par des individus qui ne sont soumis à aucun stress. Des études montrent que la dessiccation pourrait augmenter le fitness de certaines espèces de Bdelloïdes : l'espèce *Adineta ricciae* produit significativement plus d'œufs que les contrôles hydratés (Ricci et Caprioli, 2005). Il serait intéressant de confronter des organismes à un parasite directement après avoir été soumis à une dessiccation de manière

à voir s'ils sont plus résistants que des individus n'ayant jamais été confrontés à un manque d'eau.

En conclusion, bien que ce travail donne quelques éclaircissements sur les relations hôte-parasite chez les Bdelloïdes, il suscite beaucoup d'autres questions qui nécessitent l'utilisation de tables de survie. Ces dernières permettront probablement de réduire la variabilité résiduelle et d'obtenir d'avantage d'informations concernant l'impact du parasitisme sur le fitness et les modifications des traits d'histoire de vie des Bdelloïdes.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Agnew P., C. Koella J. & Michalakis Y. (2000) Host life history responses to parasitism. *Microbes and infection*, 2, 891-896.
- Alpert P. (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or so rare. *The journal of experimental biology*, 209, 1575-1584.
- Arkipova I. & Meselson M. (2004) Deleterious transposable elements and the extinction of asexuals. *Bioessays*, 27, 76-85.
- Barron G. L. (1985) Fungal parasites of bdelloid rotifers: *Diheterospora*. *Canadian journal of botany*, 63, 211-222.
- Barron G. L. & Szijarto E. (1982) Structure and biology of a new hyphomycete parasitic on rotifers. *Canadian journal of botany*, 60, 1212-1215.
- Barron G. L. & Szijarto E. (1984) Fungal parasites of bdelloid rotifers: a new *Phialophora*. *Mycologia*, 76, 1107-1110.
- Barron G. L. & Szijarto E. (1990) A new genus of the hyphomycetes endoparasitic in rotifers. *Mycologia*, 82, 134-137.
- Barron G. L. & Szijarto E. (1991) A new *Harposporium* with triangular conidia attacking bdelloid rotifers. *Canadian journal of botany*, 69, 1284-1287.
- Barron G. L. & Tzean S. S. (1981) A subcuticular endoparasite impaling bdelloid rotifers using three-pronged spores. *Canadian journal of botany*, 59, 1207-1212.
- Barron G. L. (1980) A new genus of the Zygomycetes, *Canadian journal of botany*. 58, 2450-2453. (a)
- Barron G. L. (1980) A new *Haptoglossa* attacking rotifers by rapid injection of an infective sporidium. *Mycologia*, 72, 1186-1194. (b)
- Barron G. L. (1981) Two new fungal parasites of bdelloid rotifers. *Canadian journal of botany*, 59, 1449-1455.
- Barron G. L. (1983) Structure and biology of a new *Tolypocladium* attacking bdelloid rotifers. *Canadian journal of botany*, 61, 2566-2569. (a)
- Barron G. L. (1983) The biological role of *Rhopalomyces magnus*, *Mycologia*, 72, 427-430. (b)
- Barron G. L. (1986) A new *Harposporium* parasitic in bdelloid rotifers. *Canadian journal of botany*, 64, 2379-2382.
- Barron G. L. (1989) Host range studies for *Haptoglossa* and new species, *Haptoglossa intermedia*. *Canadian journal of botany*, 67, 1645-1648. (a)
- Barron G. L. (1990) A new and unusual species of *Haptoglossa*, *Canadian journal of botany*, 68, 435-438.

- Barron G. L. (1991) A new genus of Hyphomycetes endoparasitic in bdelloid rotifers with conidia that lodge in the mastax. *Canadian journal of botany*, 69, 503-506. (a)
- Barron G. L. (1991) A new genus, *Rotiferophthora*, to accommodate the *Diheterospora*-like endoparasites of rotifers. *Canadian journal of botany*, 69, 494-502. (b)
- Barron G. L. (1991) A new species of *Dwayaangam* parasitic eggs of rotifers and nematodes. *Canadian journal of botany*, 69, 1402-1406. (c)
- Barron G. L. Morikawa C. & Saikawa M. (1990) New *Cephaliphora* species capturing rotifers and tardigrades. *Canadian journal of botany*, 68, 685-690.
- Bertolani R., Guidetti R, Jönsson K. I., Altiera T., Boschini D. & Rebecchi L. (2004) Experiences with dormancy in tardigrades. *Journal of Limnology*, 63, 16-25.
- Birky C. W. Jr. (2004) Bdelloid rotifers revisited. *PNAS*, 101, 2651-2652.
- Boschetti C., Ricci C., Sotgia C. & Fascio U. (2005) The development of a bdelloid egg: a contribution after 100 years. *Hydrobiologia*, 546, 323-331.
- Brown J. R. (2003) Ancient horizontal gene transfer. *Nature reviews. Genetics*, 4, 121-132.
- Brusca R. C., Brusca G. J. & Haver N. J. (2003) *Invertebrates*. Deuxième édition. Sinauer Associates, 936 p.
- Butlin R. (2002) The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineage. *Nature reviews. Genetics*, 311-317.
- Campbell N. A. & Reece J. B. (2004) *Biologie*. Deuxième édition. De Boeck Université, 1982 p.
- Caprioli M., Krabbe Katholm A., Melone G., Ramlov H., Ricci C. & Santo N. (2004) Threalose in desiccated rotifers: a comparison between a bdelloid and a monogonont species. *Comparative biochemistry and physiology*, 139, 527-532.
- Carroll Lewis, *Ouvres complètes*, éd. Gallimard, coll. La Pléiade, 1990.
- Carton Y., Nappi A. J. & Poirie M. (2005) Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Developmental and comparative immunology*, 29, 9-32.
- Chadwick W. & Little T. J. (2004) A parasite-mediated life-history shift in *Daphnia magna*. *Proceedings - Royal Society of London*, 272, 505-509.
- Comps M. & Menu B. (1997) Infectious diseases affecting mass production of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 358, 179-183.
- Decaestecker E., Gaba S., Raeymaekers J. A. M., Stoks R., Van Kerckhoven L., Ebert D. & De Meester L. (2007) Host-parasite "Red Queen" dynamics archived in pond sediment. *Nature*, 450, 870-874.

Ebert D. 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

Ebert D. & Hamilton W. D (1996) Sex against virulence : the coevolution of parasitic diseases. *Trends in ecology & evolution*, 11, 79-82.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3, 294-299.

Fontaneto D., Herniou E. A., Boschetti C., Capriolli M., Melone G., Ricci C. & Barraclough T. G. (2007) Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS biology*, 5, 8914-921.

Fontaneto D., Herniou E., Barradough T. & Ricci C. (2007) On the global distribution of microscopic animals : New worldwide data on bdelloid rotifers. *Zoological studies*, 46, 336-346.

Gladyshev E. A., Meselson M. & Arkhipova I. R. (2007) A deep-branching clade of retrovirus-like retrotransposons in bdelloid rotifers. *Gene*, 390, 136-145.

Gladyshev E. A., Meselson M. & Arkhipova I. R. (2008) Massive horizontal gene transfer in bdelloid rotifers. *Science*, 320, 1210-3.

Glocking S. L. & Holbrook G. P. (2003) Endoparasites of soil nematodes and rotifers 1: the common and the rare. *Mycologist*, 17, 150-154.

Glocking S. L. (1998) Three new species of *Rotiferophthora* attacking bdelloid rotifers in Japan. *Mycological research*, 102, 1142-1148. (a)

Glocking S. L. (1998) Two new species of rotifer-attacking fungi, *Rotiferophthora* from Japan and records of *Verticillium bactrosporium* in rotifer hosts. *Mycological research*, 102, 145-150. (b)

Gorbunov A. K. & Kosova A. A. (2001) Parasites in rotifers from Volga Lake. *Hydrobiologia*, 446/447, 51-55.

Hebert P. D., Stoeckle M. Y., Zemplak T.S. & Francis C.M. (2002) Identification of birds through DNA barcode. *PLoS Biology*, 2, e312.

Hillis D. M. (2007) Sexual Evolution: can species exist without sex? *Current biology*, 17, 543-544.

Hotopp J. C., Clark M. E., Oliveira D. C., Foster J. M., Fischer P., Torres M.C., Giebel J. D., Kumar N., Ishmael N., Wang S., Ingram J., Nene R.V., Shepard J., Tomkins J., Richards S., Spiro D. J., Ghedin E., Slatko B.E., Tettelin H. & Werren J. H. (2007) Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science*, 317, 1753-6.

- Hur J. H. Van Doninck K., Mandigo M. L. & Meselson M. (2008) Degenerate tetraploidy was established before bdelloid rotifer families diverged. *Molecular Biology and Evolution*.
- Ivarsson H. & Jönsson K. I. (2004) Aggregation effects on anhydrobiotic survival in the tardigrade *Richtersius coronifer*. *Journal of Experimental Zoology*, 301, 195-199.
- Jog M. & Watve M. (2005) Role of parasites and commensals in shaping host behaviour. *Current Science*, 89, 1184-1191. *Nature*, 443, 569-573.
- Johnson P. T. J., Longcore J. E., Stanton D., Carnegie R. B., Shields J. D. & Preu E. R. (2006) Chytrid infections of *Daphnia pulicaria*: development, ecology, pathology and phylogeny of *Polycaryum leave*. *Freshwater Biology*, 51, 634-648.
- Judson O. P. & Normark B. B (1996) Ancient asexual scandals. *Trends in ecology & evolution*, 11, 41-46.
- Lapinski J. & Tunnacliffe A. (2003) Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS letters*, 553, 387-390.
- Little T. J., Watt K. & Ebert D. (2006) Parasite-host specificity: experimental studies on the basis of parasite adaptation. *Evolution*, 60, 31-38.
- Lively. C. M. (1996) Host-parasite coevolution and sex: do interactions between biological enemies maintain genetic variation and cross-fertilization? *Bioscience*, 46, 107-114.
- Mark Welch D.B., Mark Welch J.L. & Meselson M. (2008) Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers. *PNAS*, 105, 5145-9.
- Mark Welch J. L. & Meselson M. (1998) Karyotypes of bdelloid rotifers from three families. *Hydrobiologia*, 387/388, 403-407.
- Mark Welch J. L., Mark Welch D. B. & Meselson M. (2004) Cytogenetic evidence for asexual evolution of bdelloid rotifers. *PNAS*, 2004, 1618-1621.
- Meselson M. & Mark Welch D. (2007) Stable heterozygosity. *Science*, 318, 202-203.
- Milius S. (2000) Bdelloids: no sex for over 40 million years. *Science news*, 157, 326-327.
- Mueller G. M., Mueller G. M. & Foster M. (2004) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, 777 p.
- Pagani M., Ricci C. & Redi C. A. (1993) Oogenesis in *Macrotrachela quadricornifera* (Rotifera, Bdelloidea). *Hydrobiologia*, 255/256, 225-230.
- Panhuis T.M., Butlin R., Zuk M. & Tregenza T. (2001) Sexual selection and speciation. *Trends in ecology & evolution*, 16, 364-371.
- Pouchkina-Stantcheva N. N., McGee B. M., Boschetti C., Tolleter D., Chakrabortee S., Popova A. V. Meersman F., Marcherel D., Hinch D. K. & Tunnacliffe A. (2007) Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate, *Science*, 318, 268-271.

- Poulin R. (1995) "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *International journal for parasitology*, 25, 1371-1383.
- Prescott L. M., Harley J. P. & Klein D. (2003) *Microbiologie*. Deuxième édition. De Boeck Université, 1137 p.
- Ribecchi L., Altiero T. & Guidetti R. (2007) Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebrate Survival Journal*, 4, 65-81.
- Ricci C. & Caprioli M. (2005) Anhydrobiosis in Bdelloid species, populations and individuals. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 759-763.
- Ricci C. & Covino C. (2005) Anhydrobiosis of *Adineta ricciae*: costs and benefits. *Hydrobiologia*, 546, 307-314.
- Ricci C. & Fascio U. (1995) Life-history consequences of resource allocation of two bdelloid rotifer species. *Hydrobiologia*, 299, 231-239.
- Ricci C. & Melone G. (2000) Key to the identification of the genera of bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 418, 73-80.
- Ricci C. & Perletti F. (2006) Starve and survive: stress tolerance and life-history traits of a bdelloid rotifer. *Functional ecology*, 20, 340-346.
- Ricci C. (1983) Life histories of some species of Rotifera Bdelloidea. *Hydrobiologia*, 104, 175-180.
- Ricci C. (2001) Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia*, 446/47, 1-11.
- Ricci C., Caprioli M., Boschetti C. & Santo N. (2004) *Macrotrachela quadricornifera* featured in a space experiment. *Hydrobiologia*, 534, 239-244.
- Ricci C., Caprioli M., Boschetti C. & Santo N. (2005) *Macrotrachela quadricornifera* featured in a space experiment. *Hydrobiologia*, 2005, 239-244.
- Ricci C., Caprioli M., Fontaneto D. & Melone G. (2007) Volume and morphology changes of a bdelloid rotifer species (*Macrotrachela quadricornifera*) during anhydrobiosis. *Journal of morphology*, 269, 233-239.
- Ricci C., Melone G., Santo N. & Caprioli M. (2003) Morphological response of a bdelloid rotifer to desiccation. *Journal of morphology*, 257, 246-253.
- Ricci C., Serra M. & Snell T. W. (2000) Small, beautiful and sexy: what rotifers tell us about ecology and evolution. *Tree*, 15, 220-221.
- Ricci C., Vaghi L. & Manzini M. L. (1987) Desiccation of rotifers (*Macrotrachela quadricornifera*): survival and reproduction. *Ecology*, 65, 1488-1494.

Robba L., Russell S. J., Barker G. L. & Brodie Juliet (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in dna barcoding of red algae (Rhodophyta). *American journal of botany*, 93, 1101-1108.

Segers H. (2007) Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclature, taxonomy and distribution. *Zootaxa*, 1564, 1-104.

Selmi G. (2001) Ectosymbiotic bacteria on ciliated cells of a rotifer. *Tissue and cell*, 33, 258-261.

Serra, M., T. W. Snell & C. E. King (2004). The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. In: A. Moya & E. Font (eds.), *Evolution. From molecules to ecosystems*. Oxford University Press, Oxford.

Smith R. J., Kamiya T. & Horne D. J. (2006) Living males of the 'ancient asexual' Darwinulidae (Ostracoda: Crustacea).

Thomas F., Guégan J. F. & Renaud F. (2007) *Ecologie et évolution des systèmes parasités*. Première édition. De Boeck Université, 426 p.

West S. A., Lively C. M. & Read A. F. (1999) A pluralist approach to sex and recombination. *Journal of Evolutionary Biology*, 12, 1003-1012.

Zahradka K., Slade D., Bailone A., Sommer S., Averbek D., Petranovic M., Lindner A. B. & Radman M. (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*.

J. JONET - *Secrétariat*
Dépt. BIOLOGIE F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles 61
B-5000 NAMUR (Belgique)
Tél. +32(0)81.72.44.18
Fax +32(0)81.72.44.20

19 DEC. 2008