

AMBIO - Résultats

Antarctic microbial biodiversity: the importance of geographical and ecological factors

DUREE DU PROJET
15/12/2008 - 30/06/2011

BUDGET
857.900 €

MOTS CLES

Antarctique, diversité microbienne, biogéographie, bactéries, cyanobactéries, micor-algues, endémisme, cosmopolitanisme

CONTEXTE

Les microorganismes dominent la plupart des écosystèmes antarctiques et jouent un rôle crucial dans leur fonctionnement. En comparaison avec les régions tempérées et tropicales, et malgré leur importance écologique, on connaît mal la diversité microbienne antarctique et sa distribution géographique. Cela est dû à un manque d'échantillonnage systématique et à l'origine géographique limitée des sites étudiés, ainsi qu'aux problèmes liés à la définition des espèces, la diversité cryptique et la difficulté d'obtenir des souches. C'est pourquoi les données de base manquent encore, bien qu'elles soient indispensables pour pouvoir observer des changements futurs de la diversité et de la structure des communautés microbiennes en fonction de changements écologiques et/ou d'introductions anthropogéniques.

Autrefois, les études de biodiversité étaient réalisées avec des méthodes traditionnelles comme l'isolement de souches bactériennes et les identifications microscopiques des cyanobactéries et protistes sur base des caractères morphologiques. Bien souvent, le concept d'espèce utilisé s'est révélé trop large, par exemple, quand des noms d'espèces tempérées étaient utilisés pour des organismes antarctiques. De plus, ces approches sont limitées à cause de la plasticité de la morphologie. Les outils moléculaires basés sur l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (SSU rRNA) ont montré une image différente de la diversité et l'existence de génotypes non encore mis en culture. Par opposition aux marqueurs phénotypiques, les approches basées sur les génotypes ont une résolution taxonomique meilleure et reflètent l'histoire évolutive des organismes. Elles permettent aussi l'étude de la distribution géographique des microorganismes. Ceci est important, car on se demande encore si l'isolement géographique joue un rôle chez les microorganismes et donc, s'ils possèdent une biogéographie. Une hypothèse d'ubiquité a été formulée par Baas-Becking (1934) qui déclarait que 'tout est partout, mais l'environnement sélectionne'. Elle est basée sur l'assomption que les tailles gigantesques des populations de microorganismes permettent une dispersion sur toute la planète et rendent impossible des extinctions locales. Cependant, des études récentes suggèrent que les microorganismes ont des aires géographiques restreintes et que l'endémisme est possible.

Le continent antarctique se prête bien à l'étude de la **biogéographie microbienne** ainsi que l'élucidation du rôle des processus historiques et des conditions environnementales contemporaines pour la constitution de la diversité microbienne et des structures des communautés. Ceci est dû à l'isolement par rapport au reste du monde, résultant de sa position géographique, la nature des courants océaniques et atmosphériques, de même que l'éparpillement des oasis terrestres (zones déglacées) le long des côtes. De plus, les habitants de ce continent doivent vivre dans des conditions extrêmes, comme des températures basses et fluctuant fortement, des intensités d'illumination contrastées de manière saisonnière, des rayonnements UV importants, et une grande sécheresse. Donc, de manière générale, ce continent recèle de **larges gradients environnementaux** qui imposent des stress sur la biodiversité et les structures des communautés. De plus, certains habitats offrent une protection par rapport aux conditions extrêmes. Par exemple, les lacs tempèrent les variations de température. En outre, des résultats préliminaires sur la diversité des aérosols dans la Péninsule antarctique ont montré le potentiel pour un transport à longue distance de la diversité microbienne, bien que la plupart des organismes soient d'origine locale.

OBJECTIFS

Avec ce projet, nous voulons étendre l'information de base sur la diversité microbienne par une analyse intégrée et standardisée de la diversité microbienne des habitats aquatiques dans les environnements terrestres antarctiques. Nous utilisons une **approche polyphasique** combinant la caractérisation morphologique par microscopie avec des techniques moléculaires pour étudier la diversité des bactéries, cyanobactéries et protistes (avec un focus sur les algues vertes et les diatomées), qui ont été identifiées comme taxons intéressants durant nos études précédentes. Le fait de travailler ensemble en parallèle sur les échantillons environnementaux et les souches isolées en culture nous permet d'obtenir une image plus complète de la biodiversité.



AMBIO - Résultats

Antarctic microbial biodiversity: the importance of geographical and ecological factors

CONCLUSIONS

a) Diversité bactérienne

Neuf échantillons ont été utilisés pour étudier la **diversité bactérienne cultivable**. Différents types de milieux de culture et trois températures d'incubation basses ont été utilisés. Au total, 3806 isolats ont été obtenus. Ils ont d'abord été caractérisés par la comparaison d'empreintes génomiques (rep-PCR) et cette étape a permis leur regroupement en environ 1400 rep-types uniques. Très peu de ces groupes incluaient des souches provenant de plus d'un échantillon. Pour identifier les organismes, le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S d'un représentant de chaque type a été partiellement ou complètement séquencé. La diversité obtenue appartenait à quatre phyla majeurs, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et *Firmicutes*. Des isolats appartenant au phylum *Deinococcus-Thermus* ont été obtenus uniquement de quatre échantillons. Beaucoup de nouveaux genres ou espèces potentiels ont été observés parmi les souches isolées. Bien que la plupart des genres obtenus aient déjà été observés en Antarctique, ce n'était pas le cas de 30 des 83 genres. De plus, plusieurs isolats appartenaient à des genres qui, jusqu'à présent, ne contenaient qu'une seule espèce, et parfois même une seule souche. La comparaison avec les séquences des banques de données publiques indique qu'un pourcentage important (42.2 %) des espèces observées est présent uniquement en Antarctique. Cependant, il est connu que seulement 5% des espèces bactériennes sont présentes dans les bases de données, et donc ce pourcentage pourrait diminuer dans le futur. Cela suggère cependant qu'on trouve en Antarctique, à la fois des taxons cosmopolites et des taxons à dispersion limitée et qui ont évolué de manière isolée.

Une sélection de souches de *Flavobacterium* a été étudiée en détail sur base de la phylogénie des gènes codant pour l'ARNr16S et *gyrB*, ainsi que des approches biochimiques et chemotaxonomiques. L'étude a révélé de nouvelles souches de *Flavobacterium micromati* ainsi que douze nouvelles espèces potentielles. Un test PCR a été développé grâce à des amorces 16S spécifiques et utilisé pour détecter ces espèces dans l'ADN environnemental de 32 échantillons antarctiques. Ce test pourra être utilisé dans le futur pour étudier la distribution de ces espèces dans les échantillons environnementaux.

b) Diversité des cyanobactéries

Différentes méthodes moléculaires ont été utilisées pour étudier la diversité des cyanobactériens par isolement de souches (5) et dans les échantillons environnementaux (95). Cinq **souches** d'Oscillatoriaceae ont été isolées de 4 échantillons continentaux. L'analyse des séquences de ces souches a permis de trouver 2 OTUs qui n'avaient pas été mises en évidence par les techniques moléculaires (bibliothèques de clones et DGGE). Ceci illustre l'importance d'une approche polyphasique pour révéler la diversité microbienne d'un échantillon environnemental.

La **diversité non cultivée** a été étudiée avec des bibliothèques de clones et des DGGE ('Denaturing Gradient Gel Electrophoresis'). Les **bibliothèques de clones** ont montré une large variation de richesse allant

de 2 à 12 OTUs ('Operational Taxonomic Units' définis comme des groupes de séquences partageant plus de 98.5% de similarité) par échantillon. Une analyse multivariée (Detrended Correspondence Analysis (DCA)) a été réalisée avec les résultats des bibliothèques de clones de 20 échantillons de Prydz Bay, les Montagnes Transantarctiques, Shackleton Range et la Péninsule Antarctique et montre que la composition en OTU est structurée géographiquement car chaque région a une flore plus ou moins unique. Les différences peuvent être dues à différentes causes, comme les différences de caractéristiques limnologiques entre les régions ou des limites à la dispersion des cyanobactéries. Nous observons aussi que les échantillons sont groupés selon la salinité. Les bandes **DGGE** de 56 échantillons ont été séquencées et groupées en 33 OTUs. La majorité (60%) a une large répartition géographique et écologique. Le reste semble limité à la biosphère froide (habitats polaires et alpins). Dans ce deuxième groupe, 5 OTUs sont potentiellement endémiques à l'Antarctique.

En conclusion, ces analyses de séquences semblent montrer l'existence de limites géographiques et environnementales à la distribution des OTUs cyanobactériens. Donc, on observe à la fois des distributions cosmopolites et potentiellement endémiques.

c) Diversité des microalgues

La **diversité des algues vertes unicellulaires** a été étudiée dans des échantillons de 33 lacs en Antarctique maritime et continental. Les 14 lignages distincts de Chlorophycées et Trébouxiophycées ont été comparés aux séquences présentes dans Genbank et montrent une large diversité phylogénétique de taxons apparemment endémiques à différents niveaux taxonomiques. Deux taxons sont détectés dans la plupart des régions, ce qui suggère qu'ils sont largement distribués dans tout l'Antarctique. La majorité des taxons (10/14) sont cependant observés dans une seule région déglacée. Une horloge moléculaire a été utilisée et calibrée avec les âges absolus estimés en situant la divergence entre les Chlorophytes et les Streptophytes à 700 ou 1500 Ma. Sur cette base, la majorité (16/26) des lignages ont des âges estimés entre 17 et 84 Ma, et ont donc probablement divergé de leurs parents les plus proches vers la période où le Passage de Drake s'est ouvert. Quelques lignages ont des longueurs de branches avec des âges estimés (330 à 708 Ma) qui précèdent la fragmentation de Gondwana. La variation des longueurs de branches semble indiquer des événements de colonisation indépendants mais rares.

Pour les **diatomées**, la **diversité cultivable** a été étudiée dans un complexe d'espèces distribué mondialement: *Pinnularia borealis*. La phylogénie moléculaire calibrée temporellement sur base des séquences concaténées *rbcL* et LSU (région D1-D2) montre la divergence des lignages de l'Antarctique continental d'un lignage d'Europe de l'Ouest vers 7.67 Ma. Les résultats concernant les algues vertes et les diatomées sont en accord avec les patrons de distribution des organismes multicellulaires et supportent l'hypothèse des refuges glaciaires, qui ont permis la survie à long-terme depuis des millions d'années et ont produit une flore et faune antarctiques spécifiques.



AMBIO - Résultats

Antarctic microbial biodiversity: the importance of geographical and ecological factors

d) **Patrons géographiques de la diversité microbienne antarctique**

Une comparaison de la **diversité cultivable** dans 41 échantillons a indiqué que la conductivité et les variables liées à la salinité expliquent de manière significative les différences dans la structure des communautés de **diatomées**, **algues vertes** et **cyanobactéries**. Une analyse de 'variation partitioning' de 41 échantillons dans lesquels tous les groupes microbiens ont été étudiés indique que les variables géographiques sont plus importantes pour les eucaryotes que pour les procaryotes. Si ces différences entre groupes taxonomiques sont confirmées, les patrons contrastés observés entre pro- et eucaryotes sont probablement liés aux caractéristiques de leurs cycles de vie (par ex. la formation de spores, stades dormants, phase asexuée). C'est pourquoi, nous suggérons que les résultats concernant un groupe microbien particulier ne peuvent être généralisés à tous les microorganismes. Des analyses par pyroséquençage 454 nous permettent de tester cette hypothèse de manière plus détaillée. Nos résultats actuels indiquent que la mise en culture et l'approche moléculaire sans cultivation sont complémentaires pour l'exploration de la diversité d'un habitat particulier, car certains taxons cultivés n'ont pas été détectés par l'analyse de pyroséquençage 454.

APPORT A UNE POLITIQUE DE DEVELOPPEMENT DURABLE

Nos analyses de biodiversité ont révélé une diversité considérable. Selon le groupe taxonomique (bactéries, cyanobactéries ou microalgues), et sur base principalement des séquences d'ARNr SSU, des espèces nouvelles et peut-être uniques à l'Antarctique ont été identifiées. Ces résultats démontrent l'immense valeur de l'Antarctique en tant que territoire encore peu exploré, qui représente une ressource importante pour des applications biotechnologiques, biomédicales et environnementales. La découverte que les lacs antarctiques contiennent une large fraction de microorganismes endémiques a des implications importantes pour la conservation de ces écosystèmes. En particulier, la définition des Zones Antarctiques Spécialement Protégées a été basée traditionnellement sur la diversité/présence d'organismes multicellulaires. Etant donné que les microorganismes, avec quelques bryophytes, lichens, deux espèces de plantes à fleurs et de petits invertébrés sont les seuls habitants permanents, ils devraient constituer un critère additionnel pour la définition des ZASP. Par exemple, une espèce endémique mais non encore identifiée de diatomée se retrouve dans quelques lacs des Larsemann Hills. La présence de ce taxon est probablement liée au fait que certains lacs ont servi des refuges glaciaires durant les maxima glaciaires passés. La protection de cette région devrait donc être une priorité. Il est aussi apparent que nous avons seulement découvert 'la pointe de l'iceberg' de la biodiversité en Antarctique. Des études ultérieures sont nécessaires et permettront très certainement d'obtenir encore plus d'organismes nouveaux ainsi qu'une meilleure compréhension de ces écosystèmes. Dans le contexte d'une augmentation probable des effets du réchauffement global (comme l'élévation des températures, augmentation de la sécheresse, changements dans les radiations UV et la couverture de neige/glace), il semble urgent d'étudier mieux l'impact des changements climatiques sur les écosystèmes antarctiques. En effet, outre la protection spécifique des taxons endémiques, la diversité microbienne totale est importante pour le fonctionnement des écosystèmes et peut être modifiée par les effets des futurs changements climatiques. De plus, un soin particulier devrait être pris pour éviter l'introduction d'espèces non-antarctiques, mais aussi leur transfert entre différentes régions du continent et les îles sub-Antarctiques. C'est d'ailleurs une des priorités pour le Comité de Protection Environnemental (CPE) du Traité Antarctique.

COORDONNEES

Coordinateur

Annick Wilmotte

Université de Liège (ULg)
Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP)
Institut de Chimie (CIP)
Sart Tilman B6
B-4000 Liège
Tel: +32 (0) 4 366 38 56 / 33 87
Fax: +32 (0) 4 366 33 64
awilmotte@ulg.ac.be

Promoteurs

Wim Vyverman

Universiteit Gent (UGent)
Protistologie en Aquatische Ecologie (PAE)
Krijgslaan 281 S8
B-9000 Gent
Tel: +32 (0)9 264 85 01
Fax: +32 (0)9 264 85 99
Wim.Vyverman@UGent.be

Anne Willems

Universiteit Gent (Ugent)
Laboratorium voor Microbiologie (LM-Gent)
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent
Tél: +32 (0)9 264 51 03
Fax: +32 (0)9 264 50 92
Anne.Willems@UGent.be

