

Darwin en Antarctique : diversité et phylogénie

A. Wilmotte (ULg)

1) Introduction

Et si en janvier 1834, le Beagle avait fait route vers la Péninsule Antarctique, et plus précisément vers l'île de Livingston (Iles des South Shetlands) ? Après quatre jours de navigation pour traverser le passage de Drake, le bateau mettait l'ancre près de la Péninsule de Byers, une large échancre dans cette île aux contours fantasques. Depuis une quinzaine d'années, elle était connue des chasseurs qui y cherchaient fortune en massacrant des centaines de milliers de phoques à fourrure. Dans les ports, Charles Darwin les avait entendu raconter comment ils se frayaient un passage à partir du rivage en tuant tout sur leur passage, ayant peine à imaginer la scène. Cette tuerie, avec jusqu'à 200 chasseurs anglais et américains présents sur l'île, n'avait duré que quelques années car les populations avaient vite été décimées. D'ailleurs, quand Charles Darwin débarque de la chaloupe du Beagle, il n'y a que peu de traces de mammifères marins. Au pied des rochers, il reste des vestiges de la chasse, des cabanes rudimentaires faites de murs de pierres empilées sur lesquels des os de baleine servent de charpente. Charles Darwin installe un petit campement dans l'une d'elles, encore en bon état, car il pleut beaucoup dans cet endroit. Le climat est froid et humide, la température dépasse rarement 3 degrés centigrade, et la pluie est chassée à l'horizontale par les vents, ce qui la rend très difficile à éviter. Les brumes se lèvent vite aussi, et peuvent rendre la visibilité pratiquement nulle en très peu de temps. Bref, un endroit peu engageant, et sur lequel Charles Darwin ne pense passer que peu de temps. Et pourtant, il se prend d'intérêt pour cet endroit. Ici, il n'y a pas grand-chose pour distraire le regard, et il s'aperçoit que c'est dans l'attention aux détails, aux petites choses, que se révèle la richesse biologique et géologique du site. Si la partie Est de l'île est constamment couverte de glaciers, la Péninsule de Byers est déglacée en janvier, à l'exception de quelques plaques de neige éparses et de la base enneigée du plateau intérieur. Celui-ci s'étend à une centaine de mètres d'altitude au-dessus du niveau de la mer. On marche sur des cailloux foncés, mais parfois des surfaces de mousses vertes ont réussi à s'installer. Quelques petits ruisseaux descendent du plateau vers la mer et s'accompagnent d'une plus grande biodiversité. Des mousses les bordent et des algues vertes filamenteuses poussent sur les pierres au milieu du courant. En retournant des pierres, Charles Darwin a l'heureuse surprise d'observer des arthropodes, des mites, ... Parfois, quand les eaux coulent plus lentement et forment des sortes de bassins, il observe une couche orange ou rose qui tapisse le fond. Au microscope, Charles voit surtout des filaments entremêlés et suppose peut-être que ce sont des algues. En relevant la tête, il observe des pétrels de neige qui tournoient autour d'un amas de rocs, dans lequel ils ont sans doute établi leur nid. Des skuas rodent dans les environs, en bons prédateurs qu'ils sont. Un jour, alors qu'il est en train de pique-niquer, trois manchots sortent de l'eau, et se dirigent vers lui, avec un air si décidé et curieux, qu'il s'attend presque à ce qu'ils lui adressent la parole. Mais non, ils se contentent de rester à l'observer pendant plusieurs heures. Le lendemain, il se surprend à les chercher du regard et regretter leur absence, car il s'est pris de sympathie pour ces petits bonhommes se dandinant en smoking. Ce qui frappe Charles Darwin est que la végétation est très pauvre. Il y

a seulement deux espèces de plantes à fleurs sur la Péninsule, *Deschampsia antarctica* (la canche antarctique) et *Colobanthus quitensis* (la sagine antarctique). Les autres végétaux présents sont des mousses et des lichens. Les mousses aquatiques servent de refuge au diptère *Parochlus steinenii*, qui est le seul insecte ailé de l'Antarctique et qui a une distribution extrêmement restreinte. Le seul autre diptère de la région est un moucheron sans ailes, *Belgica antarctica*. Il est aussi limité à certaines populations de mousses humides (comme *Sanionia* sp) et est le plus grand 'animal' de la région (0.5 cm)(Toro et al. 2007). Darwin aurait sans doute récolté des spécimens de ces deux espèces et réfléchi à l'absence d'ailes chez *Parochlus*. Un coup de vent violent lui ayant arraché des mains un des mouchérons pour le précipiter à l'Océan, il aurait réalisé que la possession d'ailes n'offrait aucun avantage dans le cas de ce biotope venteux et entouré d'eaux. Rester près du sol, bien abrité dans les touffes de mousses, est une meilleure stratégie pour ces organismes. En collectant les arthropodes, il se serait interrogé sur la façon dont ils passent l'hiver et survivent au gel. Et lors d'une excursion sur le plateau, au pied d'une élévation appelée le Cerro Negro, il aurait exhumé des troncs fossiles qui ressemblent à des conifères (Falcon-Lang & Cantrill 2001).

2) La diversité des microorganismes antarctiques, avec un focus sur les cyanobactéries de la région de la Station Princess Elisabeth (Montagnes Sør Rondane, Dronning Maud Land)

La démarche naturaliste utilisée par Charles Darwin, d'exploration de la diversité, est toujours utilisée en Sciences. Alors que Livingston Island était à portée du Beagle, il n'en va pas de même de la grande majorité du continent, encore inconnu à cette époque. Or l'Antarctique est un continent presque aussi grand que l'Australie, et encore largement inexploré. Cent septante-cinq ans plus tard, j'ai eu la chance de participer à l'expédition BELDIVA qui nous a permis de commencer l'exploration de la diversité microbienne dans la région de la nouvelle station de recherche belge, Princess Elisabeth.

Qu'est ce qui peut bien motiver l'intérêt des microbiologistes ?

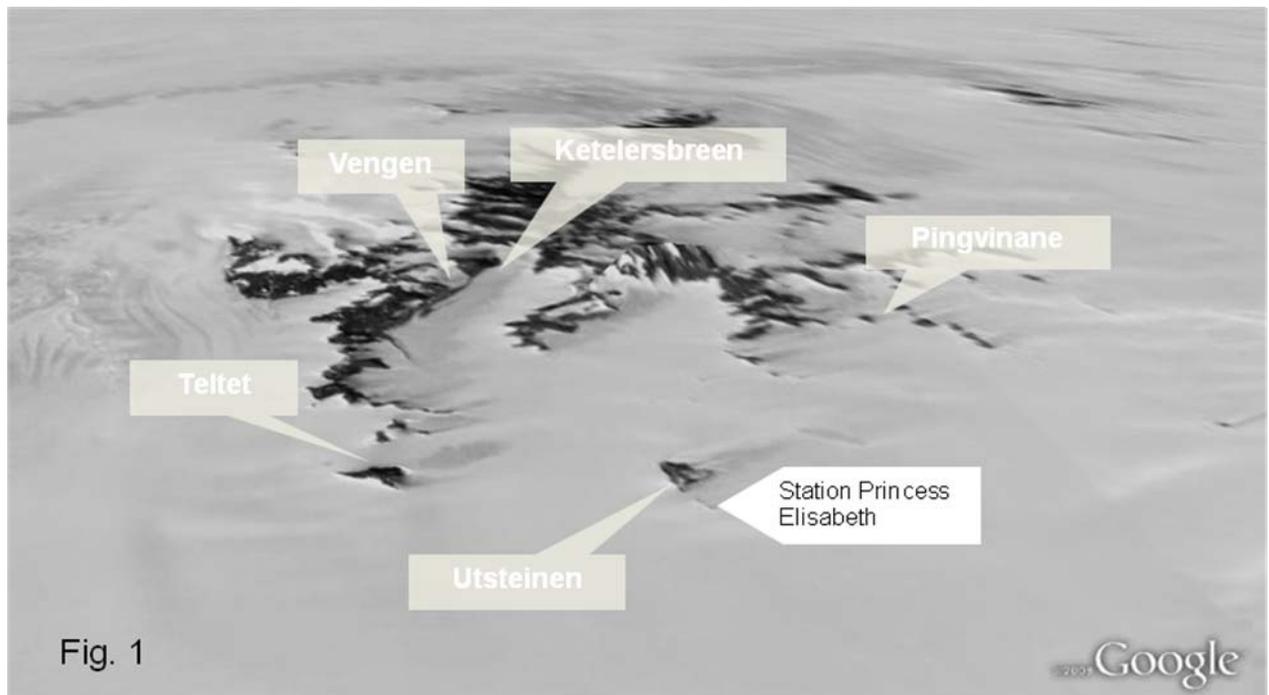
- L'Antarctique est le plus froid, le plus sec et le plus élevé en altitude des continents. Il est isolé géographiquement, par la distance, mais aussi les courants atmosphériques et océaniques circumpolaires
- Les phoques, manchots et oiseaux, qui nous viennent à l'esprit quand nous pensons à la diversité de l'Antarctique, n'y résident que de manière saisonnière et dépendent de l'Océan pour leur nourriture. Les seuls habitants permanents de l'Antarctique sont les microorganismes (et les mousses et lichens). Pourtant, ces 'héros' sont mal connus.
- Depuis les années 80, l'utilisation de marqueurs moléculaires a révolutionné l'étude de la diversité des microorganismes. On peut maintenant imaginer pouvoir réaliser un inventaire complet et objectif de celle-ci (Rappé & Giovanonni, 2003). En effet, la mise en culture introduit toujours un biais car il y a une sélection qui favorise certains taxons. D'autre part, la morphologie ne coïncide pas toujours avec la diversité

génétique. Le marqueur moléculaire le plus largement utilisé est l'ARN ribosomique 16S. Nous l'utilisons pour nos études sur les cyanobactéries, ainsi que l'espaceur qui est situé entre les gènes codant pour les ARNr 16S et 23S (Internally Transcribed Spacer).

- La possibilité de découvrir des diversités nouvelles, qui ont une histoire évolutive différente, peut-être adaptées à des conditions extrêmes ? Alors que la faune et flore des macroorganismes ont fait l'objet d'études assez poussées et que des espèces endémiques ont pu être mises en évidence (Davis et al. 2007), et parfois utilisées pour définir des zones spécialement protégées (ASPAs), ce n'est pas le cas des microorganismes. La présence de tapis de cyanobactéries est parfois citée dans la description des ASPAs mais sans beaucoup de détails.
- L'Antarctique se prête bien au test des théories écologiques concernant la distribution des microorganismes. D'après Baas-Becking (1932), 'Tout est partout mais la Nature sélectionne'. Il formule ainsi l'idée que les microorganismes ne connaissent pas de limites à leur transport et dissémination, et ce sont seulement les conditions environnementales qui leur permettront de s'établir ou pas. Grâce aux barrières entre l'Antarctique et les autres continents (distance, courants atmosphériques et océanographiques), mais aussi le fait que les zones déglacées (appelées aussi 'oasis') où on peut trouver des microorganismes sont dispersées dans des zones côtières séparées par des distances plus ou moins grandes, et que ces zones incluent souvent une large diversité de biotopes aquatiques ayant des caractéristiques environnementales diverses (salinité, pH, profondeur, nutriments...) et qui représentent des gradients écologiques, il est possible de tester si les facteurs gouvernant la répartition des organismes supérieurs s'appliquent aussi aux microorganismes. Darwin était certainement intéressé par les transports aériens d'organismes, ayant récolté des poussières tombant sur le vaisseau pour les envoyer au Professeur Ehrenberg. Il note plus tard que celui-ci y a trouvé 67 différentes formes organiques (Gorbushina et al. 2007).
- Les changements climatiques globaux sont particulièrement sensibles aux hautes latitudes. En Antarctique Steig et al. (2009) prévoient un réchauffement significatif, non seulement sur la Péninsule Antarctique mais aussi sur une partie de la calotte de l'Antarctique de l'Ouest. Pour pouvoir déterminer l'impact de ces changements, il est nécessaire de connaître la diversité de base, avant les perturbations.
- La pression anthropogénique, même réduite à l'échelle du continent, se fait sentir plus fort sur certaines régions : celles fréquentées par les touristes et celles qui entourent les stations de recherche et les campements (Cowan et Tow 2004). Pour y répondre, une annexe au Traité Antarctique traitant spécifiquement de la protection environnementale (appelée Protocole de Madrid) a été rédigée et signée en 1991. Elle oblige les signataires à mettre tout en œuvre pour limiter l'impact de toutes les activités humaines (<http://www.ats.aq/e/ep.htm>).

- La combinaison de cet afflux d'humains et de matériel, combiné au réchauffement climatique, rend plus plausible la menace d'invasions par des espèces non-natives (Frenot et al. 2005). Jusqu'à présent, on a pris en compte l'introduction d'organismes supérieurs (ex. insectes, moisissures et graines dans le projet API 'ALIENS in Antarctica', <http://classic.ipy.org/development/eoi/proposal-details.php?id=170>), mais on n'a pas d'informations en ce qui concerne les microorganismes.

La région des Montagnes Sør Rondane est peu étudiée, notamment du point de vue biologique. La station Princess Elisabeth est implantée sur une arête rocheuse dans le prolongement du nunatak Utsteinen, à 180 kms de la côte (Fig. 1). La présence des montagnes permet d'atténuer l'intensité des vents catabatiques. Le climat est un peu plus doux que dans les endroits plus exposés, et les températures moyennes vont de -8°C (décembre) à -25°C (septembre) (<http://homepages.ulb.ac.be/~fpattyn/belgianbase/welcome.html>).

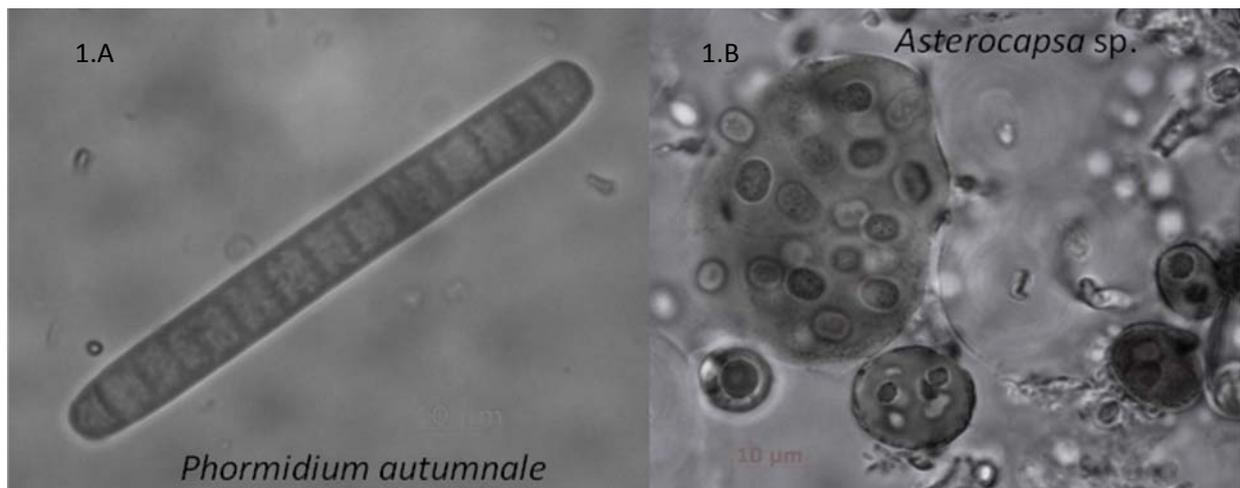


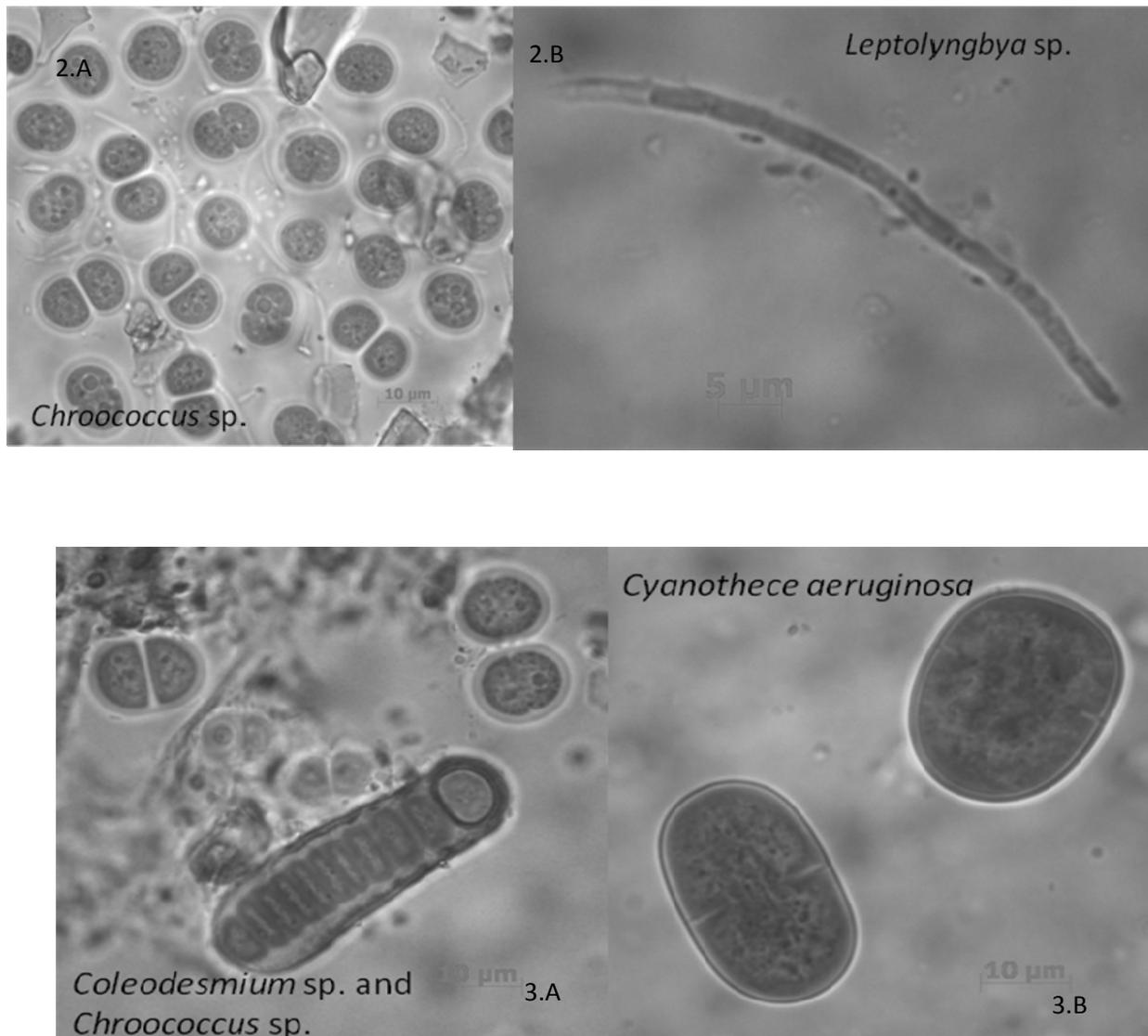
Des échantillons ont été récoltés en janvier 2007 avant la construction de la Station par Damien Ertz (Jardin Botanique National de Belgique) ainsi qu'en février 2009 par moi-même. Lors de cette deuxième mission, nous avons visité une région plus grande que celle où Damien Ertz avait pu se rendre.

La diversité morphologique des cyanobactéries est localement assez riche, mais paraît limitée à des rochers granitiques ou les graviers les entourant. On y observe des biofilms qui agglomèrent des très petits graviers, ou des mousses qui abritent des cyanobactéries et autres microorganismes. La plus grande diversité a été trouvée à Pingvinane (11 espèces, sur base de la morphologie), le côté ouest du nunatak Utsteinen (10) et l'arête rocheuse

d'Utsteinen (7), du côté opposé à la station. On y observe au total au moins 11 morphotypes de cyanobactéries : *Asterocapsa sp* (Fig. 1.B.), *Aphanocapsa sp.*, *Chroococcus sp.*(Fig. 2.A.), *Coleodesmium sp.*, *Cyanothece aeruginosa*, *Leptolyngbya sp.*(Fig. 2.B.), *Nostoc commune*, *Nostoc sp.*, *Phormidium autumnale* (Fig. 1.A), *Phormidium priestleyi*, *Phormidium sp.* Une biodiversité remarquable est aussi trouvée dans le massif granitique de Ketelersbreen. Par contre, à Brattnipane, à 50 kms de la station, tout apparaît glacé, même la base des rochers. Les vents tourbillonnants et chargés de flocons de neige raclent les surfaces comme un abrasif. Le seul endroit où j'observe de la vie photosynthétique, est quand je soulève avec un couteau de petites écailles de granit que l'érosion a déjà un peu décollé de la roche. Là, je vois des petites taches vertes, blanches ou noires. Il s'agit d'algues vertes et de lichens. Ce sont des communautés cryptoendolithiques, et leur habitat protégé leur permet de s'abriter des vents, radiations UV, tout en ayant encore un peu de lumière et d'humidité.

Si nous comparons nos résultats avec ceux de Damien Ertz, à propos du nunatak et de l'arête rocheuse d'Utsteinen, il semble y avoir une diversité moindre en 2009. Cependant, cela devrait être vérifié par des méthodes moléculaires. De plus, une explication pourrait être les mauvaises conditions climatiques (qui nous ont retardés de 4 jours) et la couverture de neige bien plus épaisse sur les rochers en janvier 2009.





3) L'analyse phylogénétique des cyanobactéries antarctiques

L'analyse de la diversité moléculaire des cyanobactéries de tapis microbiens tapissant le fond de lacs a été réalisée dans notre laboratoire pour 13 échantillons provenant de 4 régions : les Vallées Sèches de Mc Murdo, l'Antarctique de l'Est, les Montagnes Transantarctiques, et la Péninsule Antarctique. Les séquences d'une partie de l'opéron ribosomique ont été obtenues par amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) en utilisant des amorces spécifiques aux cyanobactéries. Le produit PCR contient un mélange de séquences provenant des organismes présents dans l'échantillon et il faut absolument les séparer pour pouvoir les caractériser. Cette séparation se fait par DGGE (Gel d'Electrophorèse en Gradient Dénaturant) ou par clonage (Boutte et al. 2006; Taton et al. 2006). Les séquences obtenues sont alignées avec les séquences les plus proches trouvées dans les banques de données (Genbank) et un arbre phylogénétique peut être construit. Trois grands types de méthodes existent, auquel s'est ajoutée récemment l'analyse bayésienne. Il s'agit des méthodes de distance, de maximum de parsimonie et de maximum de vraisemblance. Elles ont chacune leurs avantages et leurs limites. La

robustesse des groupements est testée par analyse de bootstrap, basée sur le rééchantillonnage. Etant donné qu'il s'agit de méthodes très différentes, basées sur des inférences et des algorithmes variés, on considère généralement que si une topologie est retrouvée par les diverses approches, elle est stable et bien supportée par les données (Peplies et al. 2008).

De plus, pour mettre un certain ordre dans les nombreuses séquences obtenues, nous utilisons le programme DOTUR (Schloss & Handelsmann 2005) pour grouper nos séquences en « Operational Taxonomic Units » (OTUs) qui contiennent les séquences d'ARNr 16S qui ont plus de 97.5 % de similitude. Ce seuil a été choisi car Stackebrandt & Göbel (1994) ont étudié la relation entre les pourcentages d'hybridation DNA:DNA (qui constituent la mesure officiellement reconnue par les taxonomistes bactériens pour déterminer si deux souches appartiennent à la même espèce ou pas) et les similitudes de séquences d'ARNr 16S. Leur conclusion est que des pourcentages de similitude inférieurs à 97% indiquent qu'on a affaire à des espèces différentes, et que des pourcentages supérieurs à 97% peuvent ou pas correspondre à la même espèce. Dans notre cas, un OTU peut donc correspondre à plus d'une espèce bactérienne, mais nous sommes certains que deux OTUs différents indiquent au minimum des espèces différentes. Au pire, notre analyse sera une sous-estimation de la diversité réelle mais il n'y aura pas d'inflation artificielle. De plus, le fait d'utiliser une mesure quantitative bien précise permet de comparer nos résultats à ceux d'autres auteurs ayant utilisé le même critère. Le désavantage de cette mesure est que l'accumulation de nouvelles séquences dans les bases de données peut provoquer des changements dans la définition des OTUs.

64 OTUs ont été obtenus au total. Dans les échantillons des biotopes les moins extrêmes (excluant les lacs hypersalins et ceux des Montagnes Transantarctiques), une diversité de 5 à 12 OTUs a été trouvée. Chaque échantillon a une diversité différente et chaque lac des biotopes les moins extrêmes a apporté en moyenne 1.5 nouveaux OTUs. Ceci indique qu'il reste pas mal de diversité à découvrir. Les OTUs qu'on retrouve dans plusieurs lacs sont aussi souvent ceux qui ont été observés par d'autres auteurs dans d'autres biotopes (microcavités dans la couverture de glace des lacs, cryoconites, microfractures dans des rochers de quartz, sols). Gordon et al. en 2000, notaient déjà qu'il y avait un continuum de la diversité entre les biotopes terrestres et aquatiques.

Sur base de ces résultats, il apparaît très intéressant d'étudier la distribution des OTUs dans d'autres biotopes et régions antarctiques, mais aussi le long de gradients géographiques vers les zones plus tempérées et vers les habitats alpins. La première partie de ce sujet est au centre du projet AMBIO (www.ambio.ulg.ac.be).

Une autre question est de déterminer l'âge des populations d'organismes antarctiques, et de savoir s'il s'agit de colonisateurs récents qui se sont établis dans les zones déglacées dès que celles-ci ont émergé de la couverture de glace, ou bien s'ils sont plus anciens. Les microorganismes ont une origine bien plus ancienne que les organismes supérieurs (environ 3 milliards d'années), et il est difficile dans ces conditions de mettre en évidence des

événements assez récents (centaine de millions d'années). C'est pourquoi, ce sont les données moléculaires provenant des arthropodes, nématodes, copépodes, lichens, etc. qui ont récemment montré que des populations ont subsisté pendant les glaciations successives du continent depuis des dizaines de millions d'années. Pour cela, il a fallu que des régions déglacées (oasis, nunataks, etc.) puissent subsister malgré les couvertures de glace importantes (Stevens & Convey 2007). Ces résultats, inattendus sur base des modèles climatiques où de tels refuges sont inexistantes, montrent l'intérêt d'étudier l'évolution et l'histoire biogéographique des organismes antarctiques, ainsi que leur utilité pour améliorer les modélisations du climat passé du continent.

Remerciements

A. Wilmotte est Chercheuse Qualifiée du FRS-FNRS. Zorigto Namsaraev, Marie-José Mano, Rafael Fernandez-Carazo, Pedro De Carvalho Maalouf, Patricia Simon, Arnaud Taton sont remerciés pour leur contribution à l'étude de la diversité des cyanobactéries antarctiques. Je suis aussi reconnaissante aux nombreux collègues antarctiques avec qui j'ai pu discuter et apprendre beaucoup d'informations, ainsi que ceux qui nous ont donné des échantillons précieux. Ces recherches ont été financées par les communautés européennes (MICROMAT), la Politique Scientifique Fédérale (LAQUAN, HOLANT, AMBIO, ANTAR-IMPACT, BELDIVA), et le FRS-FNRS (BIPOLES).

References

- Boutte C, Grubisic S, Balthasart P, Wilmotte A. 2006. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J Microbiol Methods*. 65:542-550.
- Convey P, Stevens MI. 2007. Antarctic biodiversity. *Science*. 317:1877-1878.
- Cowan DA, Tow LA. 2004. Endangered antarctic environments. *Annu Rev Microbiol*. 58:649-690.
- Davis CS, Stirling I, Strobeck C, Coltman DW. 2008. Population structure of ice-breeding seals. *Mol Ecol*. 17:3078-94
- Falcon-Lang HJ & Cantrill DJ. 2001. Gymnosperm woods from the Cretaceous (mid-Aptian) Cerro Negro Formation, Byers Peninsula, Livingston Island, Antarctica: the arborescent vegetation of a volcanic arc. *Cretaceous Res*. 22: 277-293.
- Frenot Y, Chown SL, Whinam J, Selkirk PM, Convey P, Skotnicki M, Bergstrom DM. 2005. Biological invasions in the Antarctic: extent, impacts and implications. *Biol Rev Camb Philos Soc* 80:45-72.

Gorbushina AA, Kort R, Schulte A, Lazarus D, Schnetger B, Brumsack HJ, Broughton WJ, Favet J. 2007. Life in Darwin's dust: intercontinental transport and survival of microbes in the nineteenth century. *Environ. Microbiol.* 9:2911-22

Gordon DA, Priscu J, Giovannoni S. 2000. Origin and Phylogeny of Microbes Living in Permanent Antarctic Lake Ice. *Microb. Ecol.* 39:197-202

Peplies J, Kottmann R, Ludwig W & Glöckner FO. 2008. A standard operating procedure for phylogenetic inference (SOPPI) using (rRNA) marker genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 31 : 251-257

Rappé MS & Giovannoni SJ. 2003. The uncultured microbial diversity. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-94

Schloss PD, Handelsman J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1501-6

Stackebrandt E & Göbel BM. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.

Steig EJ. , Schneider DP., Rutherford SD. Mann ME, Comiso JC & Shindell DT. 2009. Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year *Nature* 457: 459-462

Taton A, Grubisic S, Balthasart P, Hodgson DA, Laybourn-Parry J, Wilmotte A. 2006. Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Ecol.* 57:272-89.

Toro M, Camacho A, Rochera C, Rico E, Banon M, Fernandez-Valiente E, Marco E, Justel A, Avendano MC, Ariosa Y, Vincent WF, Quesada A. 2007. Limnological characteristics of the freshwater ecosystems of Byers Peninsula, Livingston Island, in maritime Antarctica. *Polar Biology* 30: 635-649.