

THÉCAMOEBIENS MUSCICOLES D'UN MUR D'ENCEINTE DU CHÂTEAU DE NEUCHÂTEL – LES PROTISTES CONSTITUENT-ILS UNE PARTIE NÉGLIGEABLE DE LA BIODIVERSITÉ OU PLUTÔT UNE « MAJORITÉ SILENCIEUSE » ?

EDWARD A. D. MITCHELL, THIERRY ARNET, AURIEL CHATELAIN,
NICOLAS DERUNGS & ENRIQUE LARA

Laboratoire de biologie du sol, Institut de Biologie, Université de Neuchâtel
Rue Emile-Argand 11, CH-2000 Neuchâtel

Mots-clés : protozoaires libres ; bryophytes ; biodiversité

Keywords : free-living protozoa ; bryophytes ; biodiversity

Résumé

L'analyse de quelques échantillons de mousses poussant sur le mur d'enceinte du château de Neuchâtel a révélé la présence de 23 taxons de thécamoebiens : dont 10 Euglyphides et 13 Arcellinides sur un total de 117 espèces recensées au total, tous groupes taxonomiques confondus. Ce total de 23 taxons est sans-doute une sous-estimation compte-tenu des découvertes récentes d'une diversité inconnue d'espèces et taxons de rangs supérieurs au sein des différents groupes de protistes, y compris chez les thécamoebiens. Ces résultats illustrent le potentiel de découverte d'une diversité méconnue dans le monde microbien, même dans des régions où la diversité des organismes vivants a été bien étudiée depuis des siècles.

Abstract

The analysis of a few moss samples collected on the walls of the castle of Neuchâtel has revealed the presence of 23 taxa of testate amoebae, among which 10 Euglyphids and 13 Arcellinids, out of an overall total of 117 observed taxa, for all taxonomic groups. As hitherto unknown species and higher taxa are continuously being discovered within the various groups of protists including testate amoebae, this total of 23 taxa is most likely an underestimation. These results illustrate the potential for discovery of a poorly known diversity within the microbial world, including in regions where the diversity of living organisms has been well studied for centuries.

INTRODUCTION

Les thécamoebiens (aussi appelées amibes à thèque ou amibes à coquille) sont des organismes eucaryotes unicellulaires amoeboides phagotrophes et principalement hétérotrophes. Ils représentent une biodiversité omniprésente mais méconnue, car ils ont à ce jour été très peu étudiés. Prédateurs de divers groupes de micro-organismes (bactéries,

champignons, autres protistes et micro-métazoaires), voir cannibales, ces protistes jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques des sols, en particulier ceux du carbone, de l'azote et de la silice (WILKINSON & MITCHELL, 2010, AOKI *et al.*, 2007, SCHROTER *et al.*, 2003).

Les thécamoebiens appartiennent à la micro-faune avec les nématodes et d'autres groupes méconnus, comme les rotifères, les tardigrades et les gastrotriches. Le terme « micro-faune » n'est toutefois pas adéquat

car bien qu'ils soient effectivement microscopiques, il ne s'agit pas d'animaux. Un thécamoebien est une amibe possédant une loge appelée thèque dans laquelle elle peut se rétracter, à la manière d'un escargot, ou s'enkyster. L'identification de l'espèce repose principalement sur la morphologie de cette thèque (forme, taille, matériel utilisé - qui peut être protéinique, siliceux, calcaire ou des particules minérales ou biogènes tenues ensemble par une matrice organique -, présence d'appendices, épines,

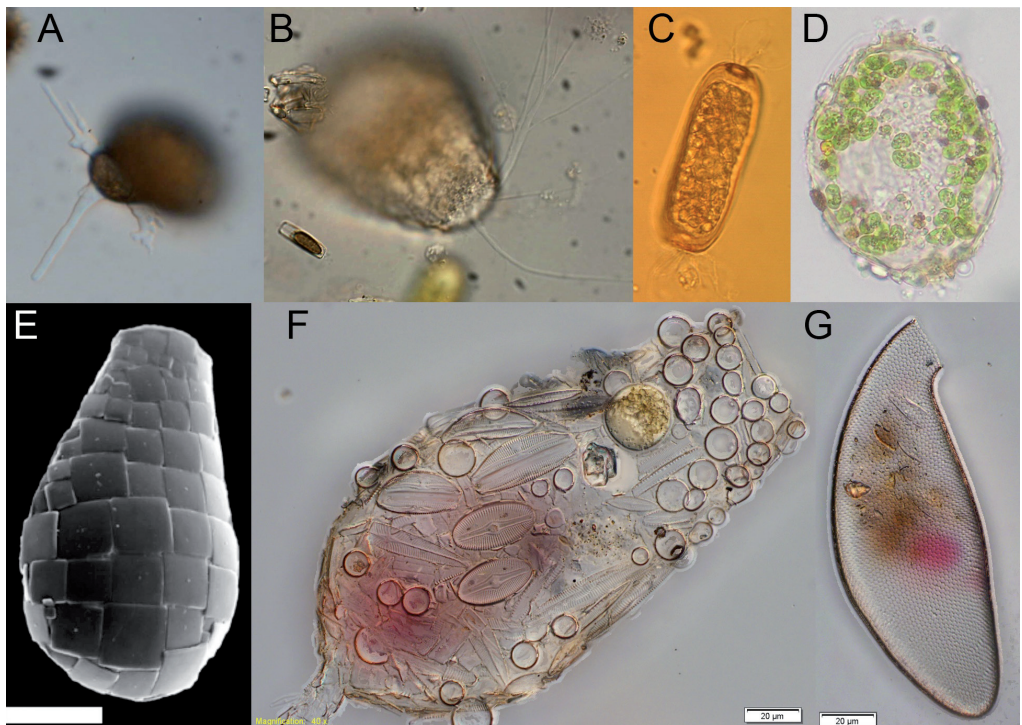


Figure 1 : Illustrations des principaux groupes de thécamoebiens. A-C: Les types de pseudopodes des trois grands groupes, A: *Arcellinida* (*Apodera vas*, Arcellinida), B: *Euglypha* sp. (Euglyphida), C: *Archella flavum* (Amphitremidae). D-G: Illustrations des types morphologiques. D: *Amphitrema wrightianum* Amphitremidae mixotrophe – les points verts sont des *Chlorella* symbiotiques; E: *Quadrulella symmetrica* (Arcellinida) – les plaques carrées sont constituées d'oxyde de silice et sont sécrétées par l'amibe; F; *Diffflugia acuminata* (Arcellinida) – l'amibe recycle des frustules de diatomées et autres particules microscopiques pour construire sa thèque; G: *Cyphoderia ampulla* – les éléments constitutifs de la thèque sont en oxyde de silice et sont sécrétés par l'amibe. F & G sont des images de la collection Penard du Muséum d'histoire naturelle de Genève, et ces deux images ont été réalisées dans le cadre d'un projet de numérisation de cette collection financée par Wikimedia.ch.

etc.). Les grands groupes se distinguent en outre par la morphologie de leurs pseudopodes (Figure 1). Cette thèque est assez résistante pour être conservée intacte après la mort de l'organisme, parfois durant des milliers d'années (HARNISCH, 1927) ou même fossilisée durant des dizaines ou des centaines de millions d'années (FOISSNER & SCHILLER, 2001, PORTER & KNOLL, 2000, BOEUF & GILBERT, 1997). Cette particularité permet leur utilisation pour la reconstruction des paléoenvironnements (CHARMAN, 2001, MITCHELL *et al.*, 2008).

La majorité des biologistes sont familiers avec la classification du vivant en cinq règnes (procaryotes, protistes, plantes, animaux et champignons), datant de 1969 (WHITTAKER, 1969). Cette classification

est toutefois caduque : plantes, animaux et champignons ne sont en effet que trois groupes parmi plus de 60 groupes principaux d'Eucaryotes, tous les autres constituant le groupe hétérogène des protistes. La position phylogénétique des thécamoebiens illustre bien le progrès réalisé dans l'étude de la classification du monde vivant durant les 20 dernières années. A l'instar d'autres groupes de « protozoaires » comme les amibes nues et les flagellés, les thécamoebiens ne constituent pas un groupe monophylétique, c'est-à-dire issu d'un ancêtre commun (ADL *et al.*, 2012). En effet, les études morphologiques et moléculaires récentes ont montré qu'ils sont constitués de trois groupes distincts : les Arcellinida ou thécamoebiens à pseudopodes lobés (genres

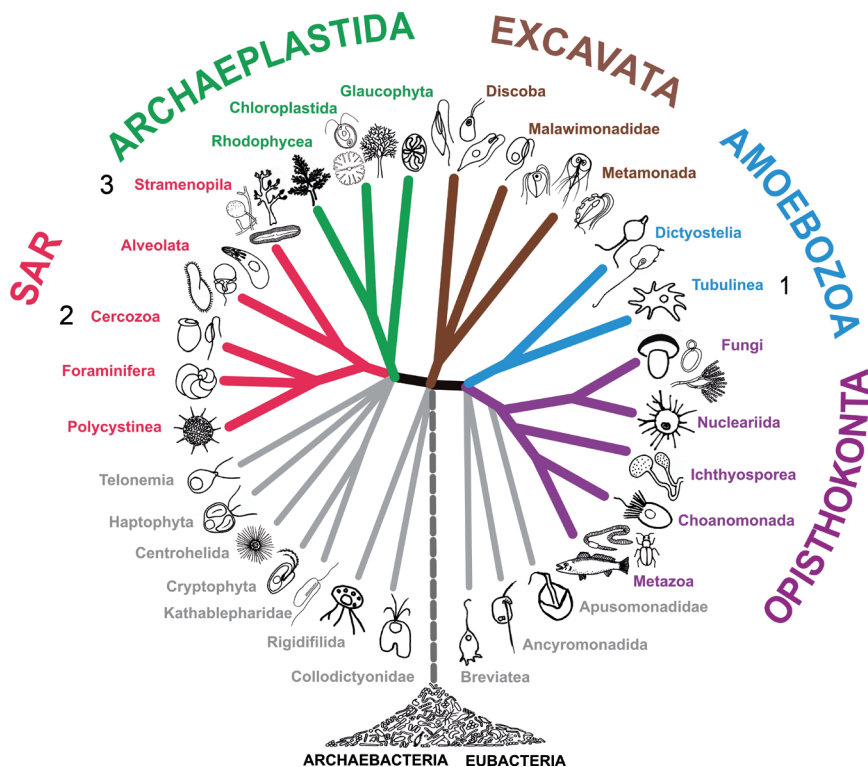


Figure 2 : Arbre des principaux groupes d'eucaryotes. Les chiffres marquent la position des trois groupes de thécamoebiens : 1: Arcellinida, 2: Euglyphida, 3: Amphitremidae. SAR = Stramenopiles + Alveolata + Rhizaria. Rhizaria = Cercozoa + Foraminifera + Polycystinea. Adapté de Adl *et al.* 2012.

Diffugia, *Centropyxis*, *Arcella*, *Nebela*, *Hyalosphenia*, etc.) (NIKOLAEV *et al.*, 2005), les Euglyphida, ou thécamoebiens à pseudopodes filamenteux (genres *Euglypha*, *Trinema*, *Assulina*, *Cyphoderia*, etc.) et les Amphitremidae (*Archerella*, *Amphitrema*), jusqu'à peu de position incertaine mais à présent placé dans les Labyrinthulomycetes (GOMAA *et al.*, 2013). Ces trois groupes appartiennent à trois grands groupes très différents d'eucaryotes : 1) les Amoebozoa, 2) Les Cercozoa (contenu dans les Rhizaria) et 3) les Straménopiles (Figure 2). Les Amoebozoa regroupent les Arcellinida ainsi que la majeure partie des amibes nues, *Amoeba*, *Chaos*, *Acanthamoeba*, *Entamoeba*, des myxomycètes comme *Dictyostelium*, et divers autres groupes. Les Rhizaria regroupent les Euglyphida, les radiolaires, foraminifères, et de nombreux autres groupes. Les Stramenopiles contiennent les algues brunes, les diatomées, les oomycètes (groupe du mildiou), et depuis peu la famille des Amphitremidae.

Le but principal de cet article est de donner un bref aperçu de la diversité morphologique et taxonomique des thécamoebiens recensés dans quelques échantillons de mousses prélevés sur les murs d'enceinte du château de Neuchâtel. Nous n'avons pas ici la prétention d'être exhaustifs. D'une part seuls quelques échantillons ont été analysés et d'autre part la taxonomie des thécamoebiens est très imparfaite et leur diversité réelle est loin d'être connue. Les noms signalés ici correspondent donc à des « morphotypes » ; leur validation ne pourrait être envisagée formellement qu'à la suite d'une étude morphologique et moléculaire poussée qui dépasse le but de cet inventaire. Nous espérons toutefois que ce court article sera à même de susciter de l'intérêt pour ces organismes méconnus mais fascinants ! La biodiversité ne se limite clairement pas à ce qui est visible à l'œil humain, bien que notre perception est encore très clairement biaisée en faveur des organismes macroscopiques !

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude répondait à un but d'inventaire servant avant tout à illustrer la biodiversité de différents groupes d'organismes dans la ville de Neuchâtel. L'échantillonnage s'est limité à prélever quelques mousses poussant sur les murs d'enceinte du château de Neuchâtel. Les thécamoebiens ont été extraits des mousses par simple filtration. Une passoire à thé suffit, mais nous avons utilisés des filtres de maille plus fine (150µm) pour éliminer les particules grossières et faciliter ainsi l'observation microscopique.

Les espèces de thécamoebiens ont été identifiées au microscope optique (microscope inversé Olympus IX81 avec contraste de Nomarski) et en utilisant divers ouvrages de détermination (BONNET, 1964, DEFLANDRE, 1928, DEFLANDRE, 1929, DEFLANDRE, 1936, PENARD, 1902, OGDEN and HEDLEY, 1980, GROSPIETSCH, 1958, HARNISCH, 1958) – aucune clé d'identification générale n'existant à ce jour. Dans la mesure du possible les différentes espèces ont été photographiées pour illustrer la diversité morphologique de ces organismes. Quelques mousses ont été prélevées en automne 2012 pour compléter les images. Le but premier de cet article étant d'illustrer la diversité et la beauté des thécamoebiens il a été jugé préférable d'obtenir quelques images supplémentaires de meilleure qualité que les clichés réalisés durant l'inventaire initial.

RÉSULTATS

Au total 23 taxons (espèces et sous-espèces) de thécamoebiens ont été recensés, dont 10 Euglyphides et 13 Arcellinides (Tableau 1, Figures 3 et 4). Trois genres dominent cette liste : *Euglypha*, *Trinema* et *Centropyxis* (quatre taxons chacun). Aucun membre de la famille des Amphitrematidae n'a été observé.

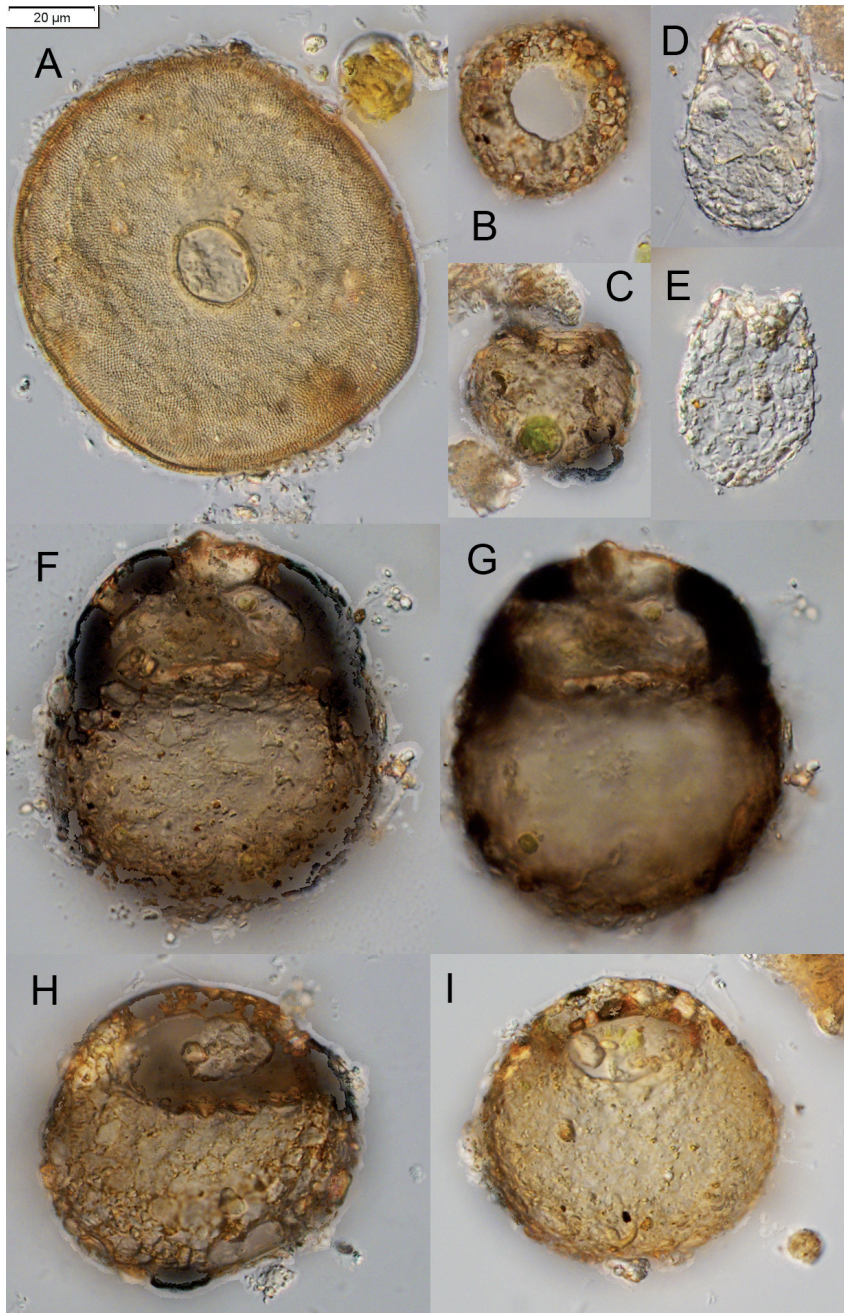


Figure 3 : Photographies de quelques thécamoebiens du groupe des Arcellinida extraits des mousses prélevées sur les murs d'enceinte du château de Neuchâtel. A: *Arcella arenaria*, B, C: *Phryganella acropodia*, D, E: *Diffugia lucida*, F, G: *Centropyxis aerophila*, H, I: *Centropyxis sylvatica*.

DISCUSSION

Comme indiqué en introduction, les espèces identifiées correspondent à des «morpho-taxons». Aucune donnée ultra-structurale (microscopie électronique à balayage ou à transmission) ou moléculaire

(barcoding d'ADN) n'est disponible pour la majorité des espèces. Un travail taxonomique considérable reste donc à faire pour qu'il soit possible de dresser avec certitude une liste d'espèce d'un échantillon. La liste présentée constitue donc clairement une estimation prudente de la diversité des

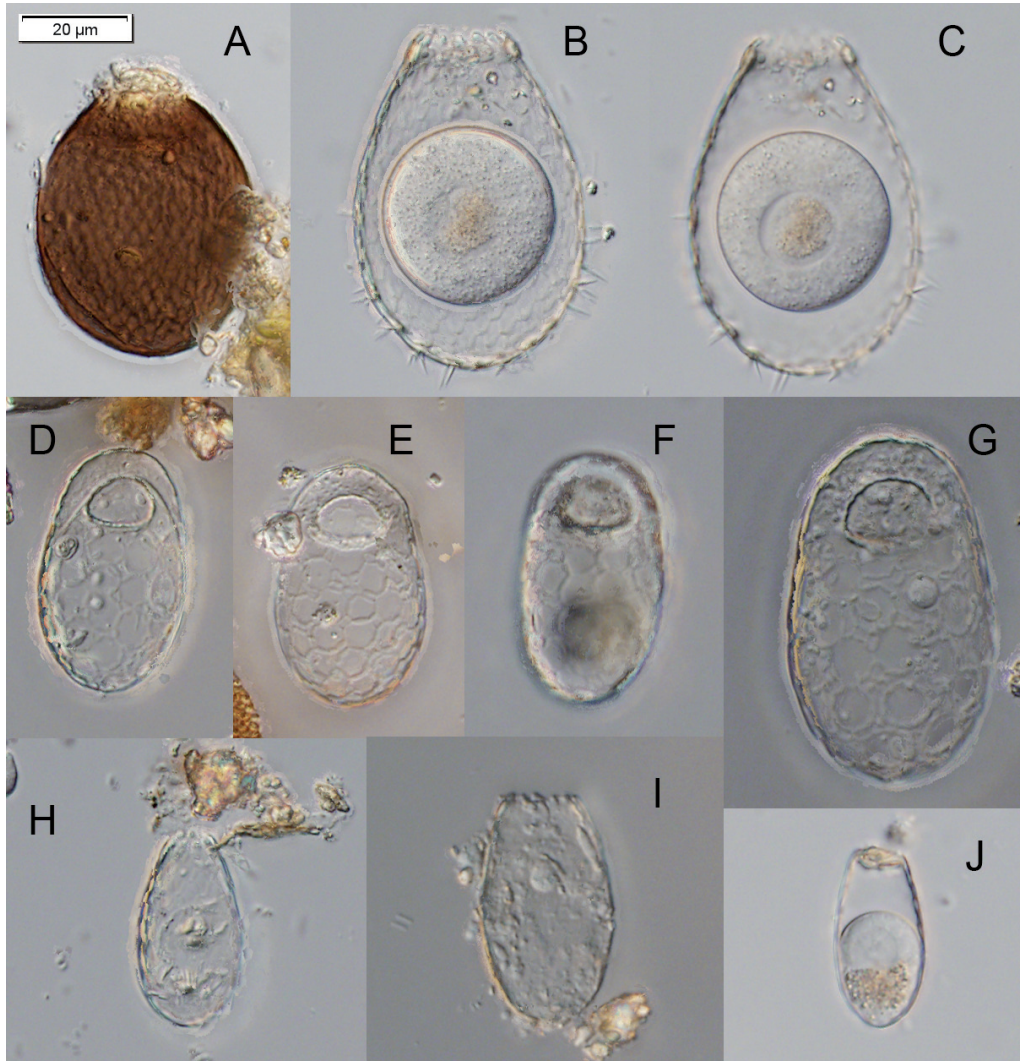


Figure 4: Photographies de quelques thécamoebiens du groupe des Euglyphida extraits des mousses prélevées sur les murs d'enceinte du château de Neuchâtel. A: *Assulina muscorum*, B, C: *Euglypha ciliata*, D, E, *Trinema* cf. *penardi*, F: *Trinema lineare*, G: *Trinema* cf. *galeata*, H: *Euglypha rotunda*, I: *Euglypha cuspidata*, J: *Trachelocorythion pulchellum*.

thécamoebiens présents dans les échantillons observés. Les illustrations montrent assez bien les différences morphologiques entre taxons. L'absence de la famille des Amphitrematidae n'est pas surprenant compte-tenu du fait qu'en Europe cette famille est essentiellement inféodée aux tourbières oligotrophes à sphaignes.

En fin d'introduction nous affirmions que notre perception de la biodiversité est encore très clairement biaisée en faveur des organismes macroscopiques. Le fait qu'une analyse succincte d'un groupe méconnu et

à la taxonomie imparfaite révèle 23 taxons sur un total - pour tous les groupes d'organismes confondus - de 117 taxons (GRANT & MULHAUSER 2013) démontre clairement le potentiel de biodiversité caché dans le monde microscopique. Nous sommes absolument convaincus que l'idée selon laquelle la biodiversité est dominée par les organismes macroscopiques, et en particulier par les insectes, est erronée et n'est que l'illustration de notre myopie. En effet, les protistes parasites (il n'est pas déraisonnable de penser que chaque espèce d'insecte doit

Super groupe	Sous-groupe	Famille	Taxon
Rhizaria	Euglyphida	Assulinidae	<i>Assulina muscorum</i>
Rhizaria	Euglyphida	Assulinidae	<i>Valkanovia elegans</i>
Rhizaria	Euglyphida	Euglyphidae	<i>Euglypha cuspidata</i>
Rhizaria	Euglyphida	Euglyphidae	<i>Euglypha polylepis</i>
Rhizaria	Euglyphida	Euglyphidae	<i>Euglypha rotunda</i>
Rhizaria	Euglyphida	Euglyphidae	<i>Euglypha strigosa</i>
Rhizaria	Euglyphida	Trinematidae	<i>Trachelocorythion pulchellum</i>
Rhizaria	Euglyphida	Trinematidae	<i>Trinema enchelys</i>
Rhizaria	Euglyphida	Trinematidae	<i>Trinema lineare</i>
Rhizaria	Euglyphida	Trinematidae	<i>Trinema cf. penardi</i>
Rhizaria	Euglyphida	Trinematidae	<i>Trinema cf. galeata</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Arcellidae	<i>Arcella arenaria</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Centropyxidae	<i>Centropyxis aerophila</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Centropyxidae	<i>Centropyxis aerophila</i> <i>var. sphagnicola</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Centropyxidae	<i>Centropyxis platystoma</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Centropyxidae	<i>Centropyxis platystoma</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Diffflugidae	<i>Diffflugia pulex</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Diffflugidae	<i>Diffflugia stouti</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Heleoperidae	<i>Heleopera petricola</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Paraquadrulidae	<i>Paraquadrula pachylepis</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Phryganellidae	<i>Phryganella acropodia</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Plagiopyxidae	<i>Plagiopyxis declivis</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Trigonopyxidae	<i>Cyclopyxis eurystoma</i>
Amoebozoa	Arcellinida	Trigonopyxidae	<i>Cyclopyxis kahli</i>

Tableau 1 : Liste des espèces de thécamoebiens observés sur le mur d'enceinte du château de Neuchâtel.

en moyenne au moins avoir une espèce propre de protiste parasite) et les protistes libres (qui sont très nettement moins étudiés que les parasites) constituent un véritable eldorado de biodiversité «dormante» qui peut être assez facilement révélé avec les moyens dont nous disposons actuellement. L'existence de cette diversité inconnue pose également la question de son rôle fonctionnel dans les écosystèmes. La question n'est donc pas de savoir si les protistes dominent

la diversité des Eucaryotes, mais plutôt de combien de temps il nous faudra pour faire accepter cette réalité !

REMERCIEMENTS

Nous remercions la fondation Wikimedia.ch pour avoir financé la numérisation d'une partie de la collection Penard du Muséum d'histoire naturelle de Genève.

BIBLIOGRAPHIE

- ADL, S.M., SIMPSON, A.G.B., LANE, C.E., LUKEŠ, J., BASS, D., BOWSER, S.S., BROWN, M.W., BURKI, F., DUNTHORN, M., HAMPL, V., HEISS, A., HOPPENRATH, M., LARA, E., LE GALL, L., LYNN, D.H., MCMANUS, H., MITCHELL, E.A.D., MOZLEY-STANRIDGE, S.E., PARFREY, L.W., PAWLOWSKI, J., RUECKERT, S., SHADWICK, L., SCHOCH, C.L., SMIRNOV, A. & SPIEGEL, F.W. (2012) The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 429-514.
- AOKI, Y., HOSHINO, M. & MATSUBARA, T. (2007) Silica and testate amoebae in a soil under pine-oak forest. *Geoderma*, 142, 29-35.
- BHATTACHARYA, D., HELMCHEN, T. & MELKONIAN, M. (1995) Molecular evolutionary analyses of nuclear-encoded small subunit ribosomal RNA identify an independent rhizopod lineage containing the Euglyphina and the Chlorarachniophyta. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42, 65-69.
- BOEUF, O. & GILBERT, D. (1997) Presence of testate amoebae (genus: *Trinema*), in the Upper Pliocene, discovered in the locality of Chillac (Haute-Loire, France). *Comptes rendus de l'academie des sciences Série II Fascicule a- Sciences de la Terre et des planetes*, 325, 623-627.
- BONNET, L. (1964) Le peuplement thécamobiens des sols. *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, 1, 123-408.
- CHARMAN, D.J. (2001) Biostratigraphic and palaeoenvironmental applications of testate amoebae. *Quaternary Science Reviews*, 20, 1753-1764.
- DEFLANDRE, G. (1928) Le genre *Arcella* Ehrenberg. Morphologie-Biologie. Essai phylogénétique et systématique. *Archiv für Protistenkunde*, 64, 152-287.

- DEFLANDRE, G. (1929) Le genre *Centropyxis* Stein. *Archiv für Protistenkunde*, 67, 322-375.
- DEFLANDRE, G. (1936) Etude monographique sur le genre *Nebela* Leidy. *Annales de Protistologie*, 5, 201-286.
- FOISSNER, W. & SCHILLER, W. (2001) Stable for 15 million years: scanning electron microscope investigation of Miocene euglyphid thecamoebians from Germany, with description of the new genus *Scutiglypha*. *European Journal of Protistology*, 37, 167-180.
- GOMAA, F., MITCHELL, E.A.D. & LARA, E. (2013) Amphitremitida (Poche, 1913) is a new major, ubiquitous labyrinthulomycete clade. *PLoS ONE*, (in press).
- GRANT, J. & MULHAUSER, B. (2013). Biocénose d'un mur d'enceinte du château de Neuchâtel. *Bull. Soc. neuchâtel. Sci. nat.* 133: 93-103.
- GROSPIETSCH, T. (1958) Wechseltierchen (Rhizopoden). *Kosmos Verlag*, Stuttgart.
- HARNISCH, O. (1927) Einige Daten zur rezenten und fossilen testaceen Rhizopodenfauna der Sphagnen. *Archiv für Hydrobiologie*, 18, 345-360.
- HARNISCH, O. (1958) II. Klasse: Wurzelfüssler, Rhizopoda. *Die Tierwelt Mitteleuropas, Band 1: Urtiere-Hohltiere-Würmer, Lieferung 1b* (eds P. Brohmer, P. Ehrmann & G. Ulmer), pp. 1-75, plates. 1-26. Quelle & Meier, Leipzig.
- HEGER, T.J., PAWLOWSKI, J., LARA, E., LEANDER, B.S., TODOROV, M., GOLEMANSKY, V. & MITCHELL, E.A.D. (2011) Comparing Potential COI and SSU rDNA Barcodes for Assessing the Diversity and Phylogenetic Relationships of Cyphoderiid Testate Amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist*, 162, 131-141.
- KOSAKYAN, A., GOMAA, F., MITCHELL, E.A.D., HEGER, T.J. & LARA, E. (2013) Using DNA-barcoding for sorting out protist species complexes - a case study of the *Nebela tinctoria-collaris-bohemica* group (Amoebozoa; Arcellinida, Hyalospheniidae). *European Journal of Protistology*.
- KOSAKYAN, A., HEGER, T.J., LEANDER, B.S., TODOROV, M., MITCHELL, E.A.D. & LARA, E. (2012) COI Barcoding of Nebelid Testate Amoebae (Amoebozoa: Arcellinida): Extensive Cryptic Diversity and Redefinition of the Hyalospheniidae Schultze. *Protist*, 163, 415-434.
- MITCHELL, E.A.D., CHARMAN, D.J. & WARNER, B.G. (2008) Testate amoebae analysis in ecological and paleoecological studies of wetlands: past, present and future. *Biodiversity and Conservation*, 17, 2115-2137.
- NIKOLAEV, S.I., MITCHELL, E.A.D., PETROV, N.B., BERNEY, C., FAHRNI, J. & PAWLOWSKI, J. (2005) The testate lobose amoebae (order Arcellinida Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist*, 156, 191-202.
- OGDEN, C.G. & HEDLEY, R.H. (1980) *An atlas of freshwater testate amoebae*. British Museum (Natural History) and Oxford University Press (London and Oxford).
- PENARD, E. (1902) *Faune rhizopodique du bassin du Léman*. Kündig, Genève.

- PORTER, S.M. & KNOLL, A.H. (2000) Testate amoebae in the Neoproterozoic Era : Evidence from vase-shaped microfossils in the Chuar Group, Grand Canyon. *Paleobiology*, 26, 360-385.
- SCHROTER, D., WOLTERS, V. & DE RUITER, P.C. (2003) C and N mineralisation in the decomposer food webs of a European forest transect. *Oikos*, 102, 294-308.
- WHITTAKER, R.H. (1969) New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163, 150–160.
- WILKINSON, D.M. & MITCHELL, E.A.D. (2010) Testate Amoebae and Nutrient Cycling with Particular Reference to Soils. *Geomicrobiology Journal*, 27, 520-533.