



HAL
open science

Effet des virus et des protistes flagellés sur les ressources nutritives et sur la dynamique et la structure de la communauté bactérienne lacustre

Lyria Berdjeb

► To cite this version:

Lyria Berdjeb. Effet des virus et des protistes flagellés sur les ressources nutritives et sur la dynamique et la structure de la communauté bactérienne lacustre. [Stage] Université Pierre et Marie Curie - Paris 6 (UPMC), Paris, FRA. 2006, 65 p. hal-02818383

HAL Id: hal-02818383

<https://hal.inrae.fr/hal-02818383>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Mémoire de Master deuxième année d'Océanographie et Environnement marin
Parcours n°6 : Océanographie pélagique
Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

Lyria BERDJEB

**Effet des virus et des protistes flagellés sur les
ressources nutritives et sur la dynamique et la
structure de la communauté bactérienne
lacustre**

Stage effectué sous la responsabilité scientifique de :

Stéphan JACQUET
&
Isabelle DOMAIZON

Equipe d'Ecologie Microbienne Aquatique
INRA-Station d'hydrobiologie lacustre
75, avenue de Corzent-BP 511
74203 Thonon cx, France

2005-2006

N'avoir qu'une seule page pour remercier les personnes dont la contribution directe ou indirecte au bon déroulement de ce stage, est inconcevable, tant elles sont nombreuses.....Et pourtant je vais devoir m'en contenter.

Mes premiers remerciements vont aux deux talentueux chercheurs sans qui cette merveilleuse et incroyable aventure n'aurait jamais eu lieu; je pense bien-sûr à mes directeurs de stage :

« Stéphan JACQUET » & « Isabelle DOMAIZON »

Vous avez toute ma gratitude pour la mise en place et la concrétisation de ce stage passionnant, pour votre capacité d'encadrement, votre disponibilité, votre compréhension ainsi que pour les motivations que vous avez su me transmettre et surtout les heures (oh combien longues) que vous m'avez consacrées.

Je remercie également l'équipe de chimie de la station d'hydrobiologie lacustre à Thonon, plus particulièrement Jérôme LAZZAROTTO, pour avoir effectué les analyses chimiques et me permettre ainsi de disposer d'une étude plus complète par rapport à la problématique posée. Mes remerciements vont également à Jean-Christophe HUSTACHE et Pascal CHIFFLET qui ont préparé le matériel de prélèvements et m'ont aidé pour l'échantillonnage.

Je remercie Sébastien PERSONIC pour sa disponibilité, les conseils et les explications prodiguées pendant toute la durée de ce stage ainsi que son soutien.

Je remercie l'équipe de microbiologie de CHambéry pour l'accueil auquel j'ai eu droit dans le cadre de mes expériences (Annie, Laetitia, Florence et Amandine).

Merci à toutes les personnes de la station pour leur sympathie et leur gentillesse qui m'ont rendue si heureuse.

Et spécialement à tous ceux qui m'ont offert leur amitié pendant ainsi mon séjour à Thonon très agréable, merci à : Leslie (l'icône), Delphine (la reine de Saba), Mélanie (la sirène), Cécile (la rose), Caroline (l'étoile), Yin (la cerise), Eric (le suprême), Nicolas (l'unique), Lionel (le timide). Morphantou (le sage) et enfin à Trevor (le british).

Mes amours de toujours (maman, SAS et FIFI) : je vous remercie de m'offrir tant d'amour de, constamment m'entourer d'énergies positives qui ont créé mon unique force dans les moments difficiles, et ont été une source d'inspiration intarissable dans tout ce que j'ai pu entreprendre et certainement dans tout ce que je compte entreprendre demain afin d'arriver au bout du chemin.

REMERCIEMENT**GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS**

I. INTRODUCTION.....	1
II. MATERIEL ET METHODE.....	6
II.1.Site d'étude et stratégies d'échantillonnage.....	6
II.2.Préparation du concentrât viral.....	7
II.3.Expérience d'enrichissement <i>in situ</i>	7
II.4.Instrumentation et protocoles d'étude.....	8
II.4.1.Mesure de l'abondance virale et bactérienne.....	9
II.4.2.Etude de la structure de la communauté bactérienne.....	10
II.4.3.Analyse des paramètres chimiques.....	14
II.5.Analyse Statistiques.....	14
III. Résultats.....	15
III.1.Condition initiales des différents paramètres mesurés.....	15
II.1.1.Lac Léman.....	15
II.1.2.Lac d'Annecy.....	16
III.2. Expériences d'Enrichissement.....	17
III.2.1.Tests méthodologiques.....	17
III.2.2.Evolution des communautés microbiennes au cours des expériences.....	17
III.2.3.Evolution des composés chimiques au cours des expérimentations.....	21
IV. DISCUSSION.....	24
IV.1. Aspect méthodologique.....	24

IV.1.1.Approches expérimentales en microcosmes.....	24
IV.1.2.Resprésentativité des communautés prélevées.....	24
IV.1.3.Analyse de la structure de la communauté Déterminée par la méthode FISH.....	25
IV.2.Facteurs régulant les abondances de la communauté bactérienne.....	26
IV.3.Facteurs régulant la structure de la communauté bactérienne.....	29
V.CONCLUSION ET PESPECTIVES.....	32
VI.REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	34
ANNEXES	
RESUME	

[NH₄⁺] : Concentration de l'ammonium

[NO₂⁻] : concentration des nitrites

[NO₃²⁻] : concentration des nitrates

[PO₄³⁻] : concentration des phosphates

<1,2 μm : fraction des échantillons filtrée sur une membrane de 1,2 μm de porosité

<11 μm : fraction des échantillons filtrée sur une membrane de 11 μm de porosité

ADN : Acide DésoxyRiboNucléique

ALF968 : sonde oligonucléotidique spécifique des α-Protéobactéries

ARN : Acide RiboNucléique

Autotrophe : organisme capable de se multiplier en utilisant des éléments minéraux comme unique source de carbone, d'azote ou de phosphore.

BETA42a : sonde oligonucléotidique spécifique des β-Protéobactéries

CEF : Cytométrie En Flux

CF319a : sonde oligonucléotidique spécifique des Cytophaga Flavobactérium

COD : Carbone Organique Dissous

CY3 : Carbocyanine 3 (fluorochrome)

DAPI : Di Aminido Phenyl Indol

EDTA : Acide Ethylène Diaminotetra Acétique

FISH : Fluorescent *in situ* Hybridization

Hétérotrophe : organisme incapable d'utiliser directement les éléments minéraux simples, ayant recours à la consommation de la matière organique pour ces besoins énergétiques.

HGC69a : sonde oligonucléotidique spécifique des actinobactéries

HRP : peroxydase raifort

I.A. : Indice d'Aromaticité

MEF : Microscope à Epifluorescence

PFA : Paraphormaldéhyde

Phage : terme utilisé pour caractériser les virus des bactéries hétérotrophes (bactériophage) et autotrophes (cyanophage)

Protozoaire : microorganisme formé d'une seule cellule, mobile au moins à un stade de leur cycle. Il se déplace par des pseudopodes (amibe), des flagelles (trypanosomes) ou des cils vibratiles (paramécies)

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

t₀ : temps zéro de l'expérience : mise à incubation des bouteilles

t₃ : temps final de l'expérience : fin de l'incubation des bouteilles.

TAC : Titre Alcalimétrique Complet

Virus : Particules microscopiques constituées simplement d'un génome (ADN ou ARN) enveloppé par une coque ou membrane protéique (capside). Parasité obligatoire c'est-à-dire qu'ils ont besoin d'un hôte spécifique pour se multiplier

La boucle microbienne (**Figure I.1**), réseau complexe caractérisé par une étroite interaction entre des communautés essentiellement bactériennes appartenant à la classe de taille dite picoplanctonique (0,2-2 μ m, *Sieburth et al., 1978*) et des communautés nano- et micro-planctoniques prédatrices des premières (flagellés, ciliés, amibes, héliozoaires) a été décrite pour la première fois par *Azam et al. (1983)*. La boucle microbienne se caractérise par une biomasse essentiellement représentée par les bactéries hétérotrophes et les picocyanobactéries, proies préférentielles des communautés de protistes flagellés et ciliés hétérotrophes et/ou mixotrophes.

Par l'abondance, la diversité taxonomique et fonctionnelle des micro-organismes qui la composent, la boucle microbienne est aujourd'hui reconnue comme un « acteur » majeur dans le fonctionnement du réseau trophique aquatique pélagique. En se greffant à la chaîne trophique classique (reliant nutriments inorganiques, phytoplancton et zooplancton), elle permet le transfert de la matière organique dissoute (MOD) issue directement de l'excrétion photosynthétique ou indirectement de l'activité de broutage du zooplancton (*Jumars et al., 1983*) vers les échelons trophiques supérieurs.

Outre son impact sur le réseau trophique aquatique, le fonctionnement de la boucle microbienne influe fortement sur la dynamique des cycles biogéochimiques en général et celui du carbone, en particulier. De nombreux travaux (*Fuhrman et al., 1989; Gasol et al., 1997*) ont montré que la communauté bactérienne représente une quantité non négligeable de carbone en terme de biomasse, de l'ordre de 30 à 50% de la biomasse totale en milieu océanique (*Li, 1998*). La participation active de cette communauté dans la régénération des nutriments (éléments indispensables à la synthèse de la matière organique par le phytoplancton) a été mise en évidence par *Williams (1981)* et *Azam et al. (1983)*. Il apparaît, donc, comme déterminant de pouvoir comprendre les facteurs responsables de la variation de la structure et du fonctionnement du bactérioplancton et d'évaluer le rôle de la boucle microbienne dans les grands cycles de la matière.

Les progrès réalisés au niveau des techniques d'identification, de dénombrement et de mesure d'activité métabolique, notamment en microscopie à épifluorescence et confocale, en cytométrie en flux (*Monger et Landery 1993; Marie et al. 1996*) et en biologie moléculaire (*Amann, 1995; Joux et Lebaron, 1995*) ont permis une avancée considérable vers cette compréhension. Ainsi, on sait que les bactéries sont des organismes ubiquistes des milieux aquatiques, et qu'ils représentent une contribution très importante de la biomasse picoplanctonique (*Smith et al., 1985, Campbell et al., 1994a*). De nombreux groupes (classes,

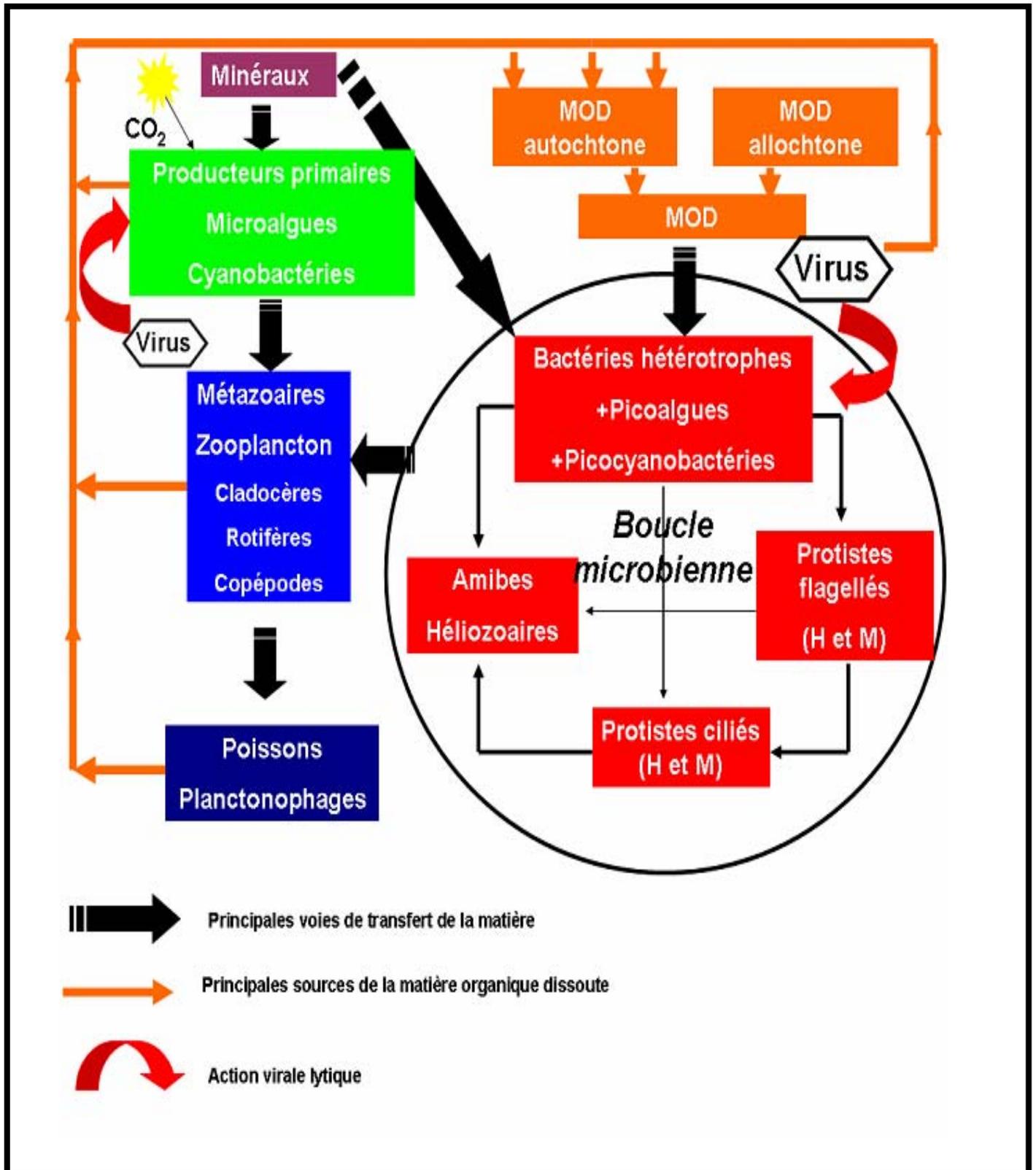


Figure I.1 : Schéma conceptuel simplifié résumant les grands compartiments et grandes voies de transfert au sein du réseau trophique pélagique lacustre. H : hétérotrophes, M : mixotrophes, MOD : Matière Organique Dissoute.

genres, espèces) ont été décrits durant les années 90 (*Eikrem et Throndsen, 1990, Andersen et al., 1993; Courties et al. 1994*) concernant les deux grands domaines Bacteria et Archaea (*Fuhrman et al., 1992; Delong et al., 1994*). De plus en plus d'études se rapportent aujourd'hui sur la diversité taxonomique des bactéries et surtout aux facteurs influents sur les variations saisonnières et temporelles de cette diversité (*Potter et al., 1997; Guillou et al., 1999b*).

Alors qu'il a été longtemps admis que la régulation de la communauté bactérienne était essentiellement liée à la disponibilité ou à la qualité des substrats organiques, il apparaît aujourd'hui que la limitation par la prédation et la lyse virale (*Fuhrman et Noble, 1995; Pace et Cole, 1996*) sont également des processus susceptibles d'intervenir significativement dans ce contrôle en opérant à différentes échelles spatio-temporelles (*Nagata et Kirchman, 1992*). Le rôle des nutriments inorganiques a aussi été clairement mis en évidence (*Thingstad et al., 1998; Smith et Paririe, 2004*). Cependant, il est difficile d'identifier le ou les facteurs limitant le développement des bactéries dans une zone donnée dans la mesure où ceux-ci covarient très souvent. Plusieurs études réalisées en milieu naturel et en conditions expérimentales (*Pace et Cole, 1996*) ont montré que le phosphore sous sa forme minérale (PO_4^{3-}) pourrait être un facteur important dans la limitation de la production bactérienne en milieu lacustre en raison des quantités considérables de carbone organique allochtone et autochtone disponibles et du rôle prépondérant de cet élément nutritif dans la régulation de la production phytoplanctonique (*Wetzel, 1983; Smith et Paririe, 2004*). En 1988, *Cole et al.* ont montré une corrélation positive entre la production phytoplanctonique et la production bactérienne dans les zones pélagiques marines et d'eau douce, ce qui suggérait que le carbone organique dissous excrété par le phytoplancton régulerait le développement de la production bactérienne. Cependant une corrélation n'est pas forcément une relation causale (*Rivkin et Anderson, 1997*), la disponibilité d'une même ressource pouvant contraindre conjointement le développement phytoplanctonique et bactérien.

Si la production bactérienne est effectivement souvent limitée par les ressources, la prédation est un élément important dans la régulation de l'abondance bactérienne (*Amblard et al., 1998*). Les protozoaires flagellés hétérotrophes sont, généralement, considérés comme les prédateurs majeurs des bactéries dans les écosystèmes aquatiques (*Pace, 1988*). Cependant les protozoaires flagellés mixotrophes (*Porter, 1988; Sanders, 1991*) et, les protozoaires ciliés (*Stockner et Portet, 1988; Carrias et al., 1996*) peuvent également intervenir de façon significative dans la prédation du bactérioplancton. Suivant les travaux de *Sherr et Sherr*

(1984), la consommation des bactéries par les protozoaires et a pu être estimée comme variant de 10 à 250 cellules par heure. Dans les milieux d'eau douce, il est important de noter que les cladocères (*Ceriodaphnia* et *Daphnia*; *Jurgens, 1994*) et les rotifères (*Ooms-wilms, 1997*) peuvent aussi et à certaines époques de l'année, présenter un impact de prédation très important sur la communauté bactérienne. Par cette action de prédation, les protozoaires et/ou le métazooplancton permettent de maintenir l'abondance bactérienne à un niveau n'entraînant pas de limitation par la ressource et d'accroître ainsi la disponibilité en éléments nutritifs et en carbone organique dissous par des processus de recyclage et d'excrétion (*Porter et al. 1985*). Enfin, grâce au rôle des protistes dans la boucle microbienne en tant que prédateurs de bactéries, une grande quantité de la production bactérienne peut être transférée vers les niveaux trophiques supérieurs.

Les tentatives de modélisation de la boucle microbienne en considérant les échanges de matière et d'énergie entre les bactéries, protozoaires et matière organique dissoute ont révélé un décalage important par rapport à ce qui était réellement observé dans le milieu aquatique (*Sime-Ngando; 1997*). Ce constat laissait fortement penser qu'il existait d'autres mécanismes méconnus qui intervenaient dans les processus de perte affectant la communauté microbienne. C'est ainsi que le compartiment viral a pris toute son importance dès le début des années 1990 avec la démonstration qu'un grand nombre de virus étaient effectivement présents dans l'eau (*Bergh et al., 1989*) et dont l'activité lytique pouvait être importante (*Suttle et al., 1990; Fuhrman, 1992*)

On sait aujourd'hui que, les particules virales sont présentes dans tous les écosystèmes aquatiques (océans, mers, estuaires, golfes, lacs, rivières, lagunes, sources hydrothermales, sédiments, glace), à toutes les latitudes (polaires, tempérées et tropicales) et de tout niveau trophique (oligotrophe à eutrophe). Leurs concentrations dépassent généralement les 1 à 10 millions de particules par millilitre d'eau, ce qui leur vaut le rang d'entité biologique la plus abondante des écosystèmes aquatiques. Les virus interviennent notamment dans la boucle microbienne aquatique en tant qu'agents infectieux des bactéries. Connus sous l'appellation de « phages », ils contrôlèrent ainsi la production bactérienne à hauteur de 20% (*Bettarel et al., 2004; Hennes et Simon, 1995; Hwang et Cho, 2002*), voire 50% (*Fuhrman et Noble 1995; Jacquet et al., 2005*) et même jusqu'à 90-100% (*Weinbauer et Hofle, 1998; Noble et Fuhrman, 2000*). L'impact du fonctionnement lytique des virus ne s'arrête pas à ce seul effet. La composition, la structure ainsi que la diversité bactérienne sont des paramètres susceptibles d'être modifiés par la lyse virale. D'après le concept de « Killing the winner » (que le meilleur soit tué !), formulé par *Thingstad et Lingnell (1997)*.

Les virus tuent les microorganismes les plus compétitifs et peuvent ainsi garder le contrôle sur les populations ou espèces dominantes. En effet, les groupes bactériens dominants, numériquement parlant, ont une probabilité de rencontre avec un pathogène plus importante, si bien que la lyse virale sur cette population a mathématiquement plus de chance de s'opérer. De la sorte, le maintien de la diversité bactérienne est assuré avec une co-existence de populations moins compétitives et « plus » minoritaires. Un contrôle indirect de la diversité bactérienne par les virus peut se faire par le mécanisme de transfert de gènes, à travers deux processus : la transformation et la transduction. Dans le premier cas, le transfert génétique résulte de la libération de l'ADN par les virus lors de la lyse bactérienne, et cet ADN libre peut être récupéré et utilisé par d'autres organismes. Dans le second cas, c'est au cours du processus de lysogénie que le transfert génétique a lieu; le virus incorporant une partie du matériel génétique de son hôte au sien avant de l'injecter dans une autre cellule hôte (Fuhrman, 2001). Les résultats de Middelboe *et al.* (1996) ont permis de vérifier l'hypothèse émise par de nombreux auteurs (Fuhrman, 1992; Proctor *et Fuhrman*, 1992; Murray *et Eldridge*, 1994) selon laquelle la production lytique peut influencer de façon notable le fonctionnement et le rendement du réseau trophique aquatique. Ceci est lié au fait que la lyse bactérienne par les virus :

- 1) contribue fortement au recyclage des nutriments. En effet, lorsqu'une cellule hôte est lysée, les virus libérés ainsi que les débris cellulaires constituent des produits riches en éléments azotés, phosphorés ou carbonés (protéines, acides nucléiques) potentiellement exploitables par les producteurs primaires comme éléments nutritifs (Golder *et al.*, 1997; Noble *et al.*, 1999). Suivant le modèle réalisé par Wilhelm *et Suttle* (1997), 6 à 26% du carbone organique, fixé au cours de la photosynthèse est recyclé en matière organique dissoute par lyse virale. Paul *et al.* (1991) ont suggéré qu'entre 1 et 12% de l'ADN total dissous dans l'eau de mer « se retrouve » dans les virus.
- 2) réduit la contribution de la production bactérienne aux flux de matière et d'énergie vers les maillons trophiques supérieurs. En effet au cours de la phase lytique, la bactérie est détruite et donc n'est plus consommable et consommée par les prédateurs protistes, affectant leur propre production et ainsi de suite par un effet en cascade jusqu'aux prédateurs supérieurs.

Paradoxalement au rôle potentiel ou démontré de ces virus, on ne sait encore quasiment rien de l'effet des virus sur la dynamique de la diversité bactérienne et si cet impact est direct ou indirect via la redistribution de la matière organique dissoute et des nutriments

inorganiques. Cette affirmation est particulièrement vraie pour les milieux d'eau douce où un retard important par rapport à l'océanographie a été souligné (*Bettarel et al., 2004; Sime-Ngando et al., 2003; Jacquet et al., 2005*).

L'objectif de ce travail a été de participer à une meilleure compréhension du fonctionnement du réseau trophique pélagique microbien en milieu lacustre, en s'intéressant plus particulièrement à l'importance relative de la lyse virale et de la prédation dans la régulation des communautés bactériennes. Il a été question d'évaluer l'effet des virus et des protistes flagellés sur les ressources nutritives (carbone, phosphore et azote) et sur la structure du compartiment bactérien. Dans cette optique, des expériences *in situ* ont été réalisées à partir d'échantillons provenant des lacs Léman et d'Annecy (deux parmi les plus grands lacs naturels français et présentant des statuts trophiques différents). Ces expériences ont consisté à enrichir en fraction virale des microcosmes d'1 litre incubés avec les principaux constituants de la boucle microbienne (virus, bactéries, protistes flagellés et les rares ciliés inférieurs à 11 μm) ou uniquement avec des bactéries et des virus après filtration à travers une maille filtrante de 1,2 μm . La dynamique de chaque communauté a été suivie pendant quatre jours par cytométrie en flux (CMF) et par microscopie à épifluorescence (MEF). La structure bactérienne et ses variations ont été appréhendées par la méthode TSA-FISH en microscopie à épifluorescence au moyen de différentes sondes oligonucléotidiques ciblant les principaux groupes du domaine des bactéries (*Fuhrman et al. 1992; Delong et al., 1994*). Les effets de l'enrichissement viral et de la prédation sur l'évolution des ressources nutritives (phosphore total, orthophosphates, carbone organique total, carbone organique et inorganique dissous, azote total, nitrate, nitrite et ammonium) et d'indices de qualité de la matière organique nommé SUVA (Specific UV Absorbance) ont été mesurés.

Les questions fondamentales auxquelles nous avons tenté de répondre ont été les suivantes :

- Quel est l'impact de la lyse virale et de la prédation par les protistes flagellés sur la dynamique et la structure bactérienne ?
- Quelle est l'importance de la lyse virale et de la prédation par les protistes flagellés sur l'évolution des ressources nutritives ?

II.1. Sites d'étude et stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements nécessaires à la réalisation de nos expériences ont été effectués au début du mois de mars 2006 dans l'épilimnion du lac Léman et du lac d'Annecy. L'échantillonnage a été réalisé au niveau des stations de références de ces lacs où sont enregistrées les profondeurs maximales (**Figure II.1**).

Le lac Léman (46°27'N, 06°32'E, 372 m d'altitude) est le plus grand lac naturel d'Europe occidentale. Il est situé à l'extrémité Ouest de la Suisse et au nord du département français de la Haute-Savoie. De forme allongée (72,3 et 13,8 km de longueur et de largeur respectivement), il est orienté suivant un axe Est-Ouest. Il est caractérisé par une superficie de 580 km² et un volume d'eau total de 89 milliards de m³. Sa profondeur moyenne est de 152,7 m et sa profondeur maximale de 309,7 m. Le temps de résidence de ses eaux est d'environ 11,5 ans.

Le lac d'Annecy (45°54'N, 07°49'E, 447 m d'altitude) constitue le deuxième plus grand lac naturel entièrement français (le lac du Bourget étant le premier). Il est également situé dans la partie Est de la France, en Haute-Savoie. De forme allongée (14,6 et 3,2 km de longueur et de largeur respectivement), il est orienté suivant un axe Nord-Sud. Il est caractérisé par une superficie de 28 km² et un volume d'eau total de 1,1 milliards de m³. Sa profondeur moyenne est de 30 m pour une profondeur maximale de 65 m. Le temps de résidence de ses eaux est approximativement de 10 ans.

Depuis les années soixante, ces deux lacs font l'objet d'un suivi régulier (du point de vue de la qualité des eaux) sous l'égide de la CIPEL pour le Léman (Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman contre la pollution) et du SILA (Syndicat Intercommunal du Lac d'Annecy) pour le lac d'Annecy. En 2006, suivant les critères de l'ODCE (Organisation for Economic Co-operation and Development, 1982, Annexe I), les lacs Léman et d'Annecy sont respectivement mésotrophe et oligotrophe. Le premier prélèvement a eu lieu sur le lac Léman le 3 mars 2006 afin de réaliser le concentrât viral (voir plus loin) et a été suivi d'un deuxième prélèvement trois jours plus tard le 6 mars 2006, correspondant au t₀ de l'expérience d'enrichissement *in situ*. Les prélèvements opérés sur le lac d'Annecy ont été effectués avec la même stratégie que celle

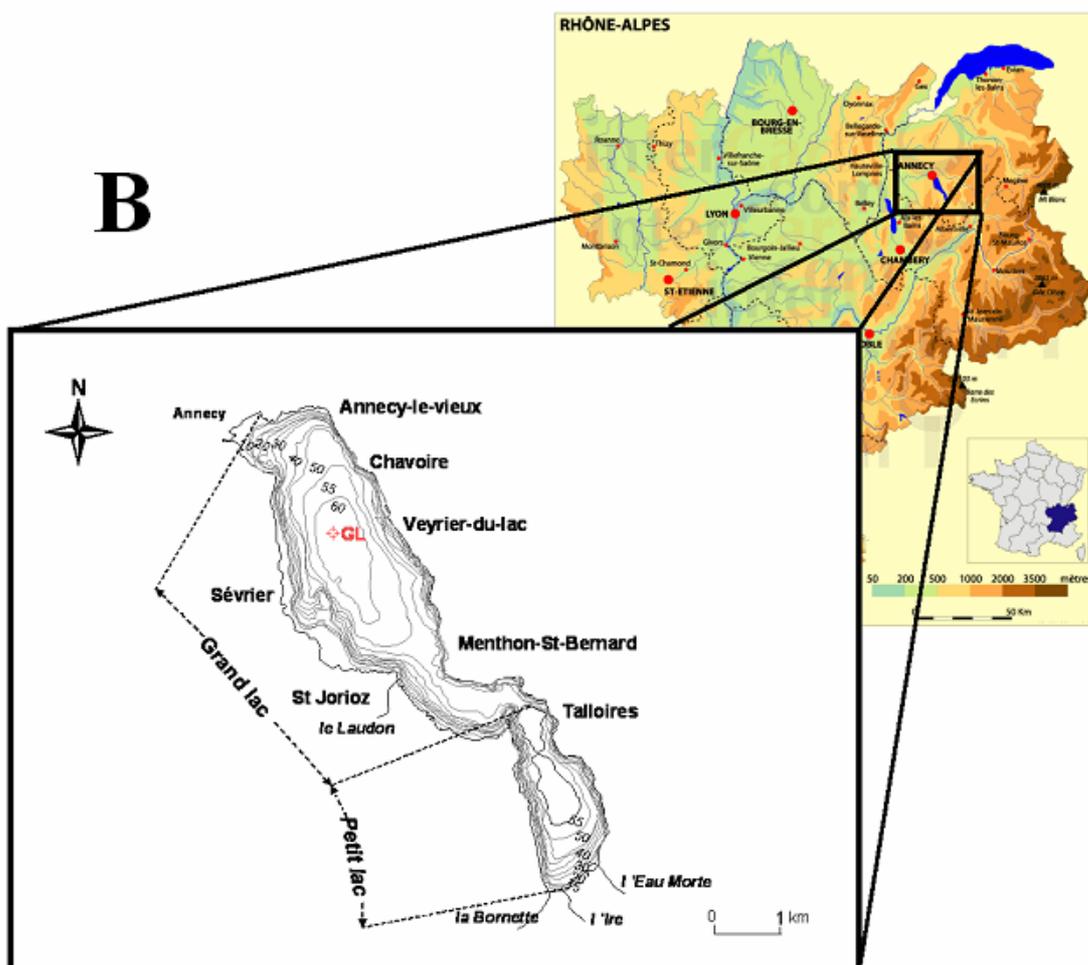
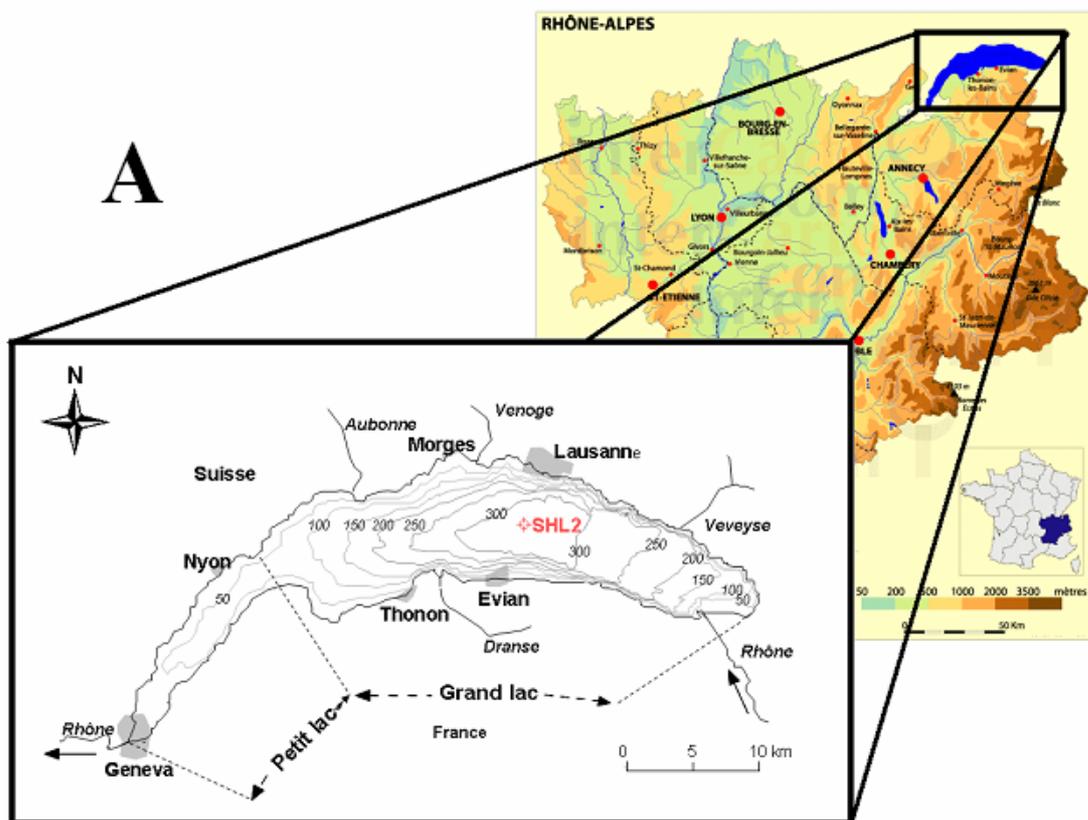


Figure II.1: Cartes bathymétriques simplifiées représentant (A) le lac Léman et la station de prélèvement SHL2, et (B) le lac d'Annecy et la station de prélèvement GL.

décrite pour le Léman le 10 et le 13 mars 2006. A chaque prélèvement, les 20 litres d'eau ont été échantillonnés et correspondaient à un profil intégré de l'épilimnion (couche d'eau située entre 0 et 8 m de profondeur) où les conditions de lumière et de température étaient proches de celles du lieu d'incubation (voir plus loin).

II.2. Préparation du concentrât viral

Le concentrât viral nécessaire pour l'expérience d'enrichissement a été obtenu à partir d'une série d'étapes de filtration, d'ultrafiltration et de centrifugation.

Pour chacun des deux lacs, 20 litres d'eau ont tout d'abord été filtrés à travers des filtres de porosité 0,7 μm (Whatman) puis à travers des filtres de porosité 0,2 μm (Nucléopore) montés sur une rampe filtrante en acier inoxydable, elle-même reliée à une fiole mise sous pression (< 100 Kpa) de 5 litres, au moyen d'une pompe à air. A partir de la méthode d'ultrafiltration décrite par *Suttle et al.* (1991), le filtrat obtenu a été concentré à environ 160 ml en utilisant une cassette VivaFlow (Vivascience) de porosité 30 KDa, reliée à une pompe péristaltique.

Afin de réduire le volume d'eau et d'augmenter encore le concentrât en nombre de particules virales, l'ultrafiltrat a été centrifugé pendant 3 heures à 28 000 tours.min⁻¹ et à 8°C. En tout, 12 ml de culot ont été obtenus (à partir de 6 tubes) et ont été resuspendus dans 50 ml de tampon TRIS-EDTA (TE, 10 mM TRIS base, 1 mM acide éthylène diaminotetra acétique (EDTA) à pH 8) préalablement autoclavé et filtré à travers des filtres de porosité 0,2 μm . L'ensemble représentait alors la solution dite « enrichie ». La même quantité de surnageant (12 ml) a été gardée et diluée dans la même quantité de TE puis autoclavée pour être utilisée comme solution « contrôle ». Les solutions enrichies et contrôle ont été conservées à 4°C jusqu'à l'expérience d'enrichissement *in situ* trois jours plus tard, cette préservation pendant quelques jours n'affectant pas les propriétés biologiques des solutions (Jacquet, non publié).

L'efficacité de la filtration, de l'ultrafiltration et de la centrifugation a été vérifiée par analyse de l'eau traitée à chaque étape, par cytométrie en flux (voir résultats).

II.3. Expérience d'enrichissement in situ

Les 20 litres d'eau échantillonnés, pour l'expérience d'enrichissement *in situ*, provenaient de la même zone de prélèvement que celle du concentrât viral. Afin de discriminer l'impact de la prédation sur les communautés bactériennes de celui lié à la lyse virale, deux traitements ont été mis en place (**Figure II.2**). L'eau échantillonnée a été, dans un premier temps, filtrée à travers une maille de 11 μm (afin d'obtenir un échantillon d'eau constitué de virus, bactéries et protistes flagellés inférieurs à 11 μm en taille). La moitié de ce

filtrat a été conservée pour constituer les traitements '<11µm'. L'autre moitié a été filtrée à travers un filtre GFC de porosité 1,2 µm (afin d'obtenir un échantillon d'eau constitué uniquement de virus et bactéries). L'eau filtrée pour chacun des deux traitements ainsi préparée a été alors mise dans des bouteilles en verre d'1 litre préalablement lavées à l'acide (HCl à 10% de concentration finale), rincées trois fois avec de l'eau ultrapure et finalement autoclavées avant utilisation.

Une fois les 12 bouteilles remplies (6 bouteilles avec l'eau filtrée à travers 11 µm et 6 bouteilles avec l'eau filtrée à travers 1,2 µm), trois bouteilles de chaque traitement (constituant donc un triplicat) ont été enrichies avec soit 10 ml de la solution concentrée en virus soit 10 ml de la solution contrôle (**Figure II.2**). Les bouteilles ont alors été placées dans une caisse immergeable puis mises à incuber dans le port de la Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre à 1 m de profondeur pendant 4 jours.

Pour l'analyse des abondances microbiennes et des paramètres chimiques, des prélèvements ont été effectués dans chaque bouteille quotidiennement pendant quatre jours à t0, t1, t2 et t3 correspondant respectivement et approximativement (à 1 heure près) à 0, 24, 48, 72 heures de temps après le remplissage et l'enrichissement des bouteilles avec les solutions virales ou contrôles. Pour apprécier les modifications de structure bactérienne, l'échantillonnage des bouteilles a été réalisé à t0 et à t3 uniquement. Le volume d'eau prélevé dans chacune des 12 bouteilles a été respectivement de 10 ml pour l'analyse des abondances en cytométrie en flux, 20 ml pour l'analyse du carbone organique dissous, 30 ml pour l'analyse des flagellés (uniquement dans les bouteilles correspondant au traitement <11 µm) et enfin 160 ml pour les analyses chimiques. En opérant de la sorte, il restait à t3 plus de la moitié du volume d'eau initial, permettant de limiter au maximum la réduction des volumes et l'effet de confinement associé.

II.4. Instrumentation et protocoles d'étude

- Les variations d'abondance virale et bactérienne ainsi que les modifications de structure bactérienne ont pu être étudiées grâce à deux instruments de mesure performants: la cytométrie en flux (CMF) et la microscopie à épifluorescence (MEF) couplée à la méthode dite TSA-FISH (Thyramide Signal Amplification – Fluorescent In Situ Hybridization). Par ailleurs, les abondances de flagellés présents dans

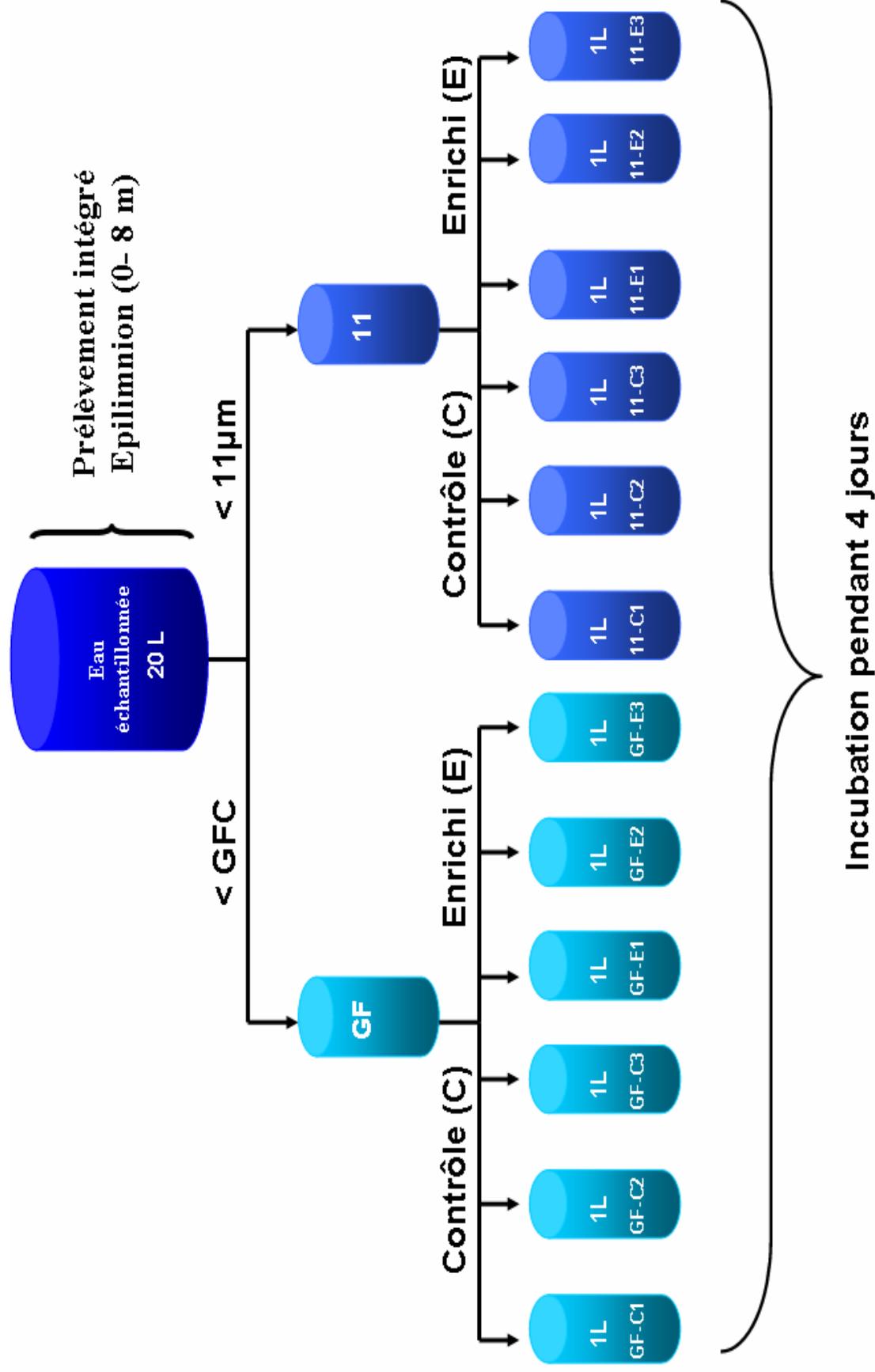


Figure II.2: Schéma résumant les étapes de prélèvement et de filtration de l'eau utilisée dans le cadre de nos expériences (voir texte pour plus de détails), Enrichie (E) = traitement avec l'eau enrichi en particules virales. Contrôle (C) = traitement avec l'eau non enrichie en particules virales.

la fraction $< 11\mu\text{m}$ au début de chacune des expérimentations ont été estimées en MEF après marquage à la primuline au début de l'expérience (t_0) uniquement.

II.4.1. Mesure de l'abondance virale et bactérienne

II.4.1.1. Principe de fonctionnement du cytomètre en flux

La CMF est un instrument de mesure permettant le dénombrement rapide d'un grand nombre de particules ou cellules (1000 à 10000 évènements. s^{-1}) en suspension dans un liquide et la discrimination de sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille. Enfin, il est possible sur certains instruments de trier ces populations en fonction de leurs propriétés optiques. D'abord utilisée pour discriminer et énumérer les populations phytoplanctoniques (*Olson et al., 1985*), la CFM a été ensuite appliquée avec succès à l'analyse des communautés bactériennes hétérotrophes (*Monger et Landry, 1993 ; li et al., 199 ; Marie et al., 199 ; Marie et al., 1999*). Depuis 1999, il est également possible de discriminer et compter plusieurs groupes viraux (*Marie et al. 1999; Duhamel et al., 2006*).

Le cytomètre utilisé au cours de cette étude a été le type FACSCalibur (Becton Dickinson), équipé d'une source laser fournissant une puissance de 15 mW à la longueur d'onde de 488 nm (**Figure II.3**). Son principe de fonctionnement réside sur la mise en pression d'un liquide de gaine d'entraînement et de l'échantillon lui-même de telle manière que les particules en suspension dans l'échantillon se retrouvent aspirées puis rapidement alignées les unes derrière les autres au sein d'un flux laminaire. C'est la configuration particulière de la chambre d'injection qui permet d'aligner les cellules en file indienne si bien qu'elles passent alors l'une après l'autre devant le faisceau laser. L'intersection de chaque cellule orthogonale à l'axe de défilement provoque d'une part la diffusion de la lumière et, d'autre part l'excitation des cellules. La diffusion du signal est traduite en signal électrique par une photodiode dans l'axe du laser, renseignant un premier paramètre nommé FALS (Forward Angle Light Scatter), proportionnel au diamètre des cellules. Un second paramètre relatif à la taille et à l'indice de réfraction des cellules, nommé RALS (Right Angle Light Scatter) est obtenu grâce à un photomultiplicateur placé à 90° via un premier miroir dichroïque. L'état excité des cellules est un état instable, et leur retour à un état stable se traduit par la transmission de signaux optiques sous forme de fluorescence dans une gamme de longueurs d'onde données (vert, orange ou rouge) suivant le filtre utilisé et l'évènement considéré (virus et bactéries marqués à l'aide d'un fluorochrome des acides nucléiques, fluorescence naturelle des cellules riches en pigments chlorophylliens, phycoérythrine ou

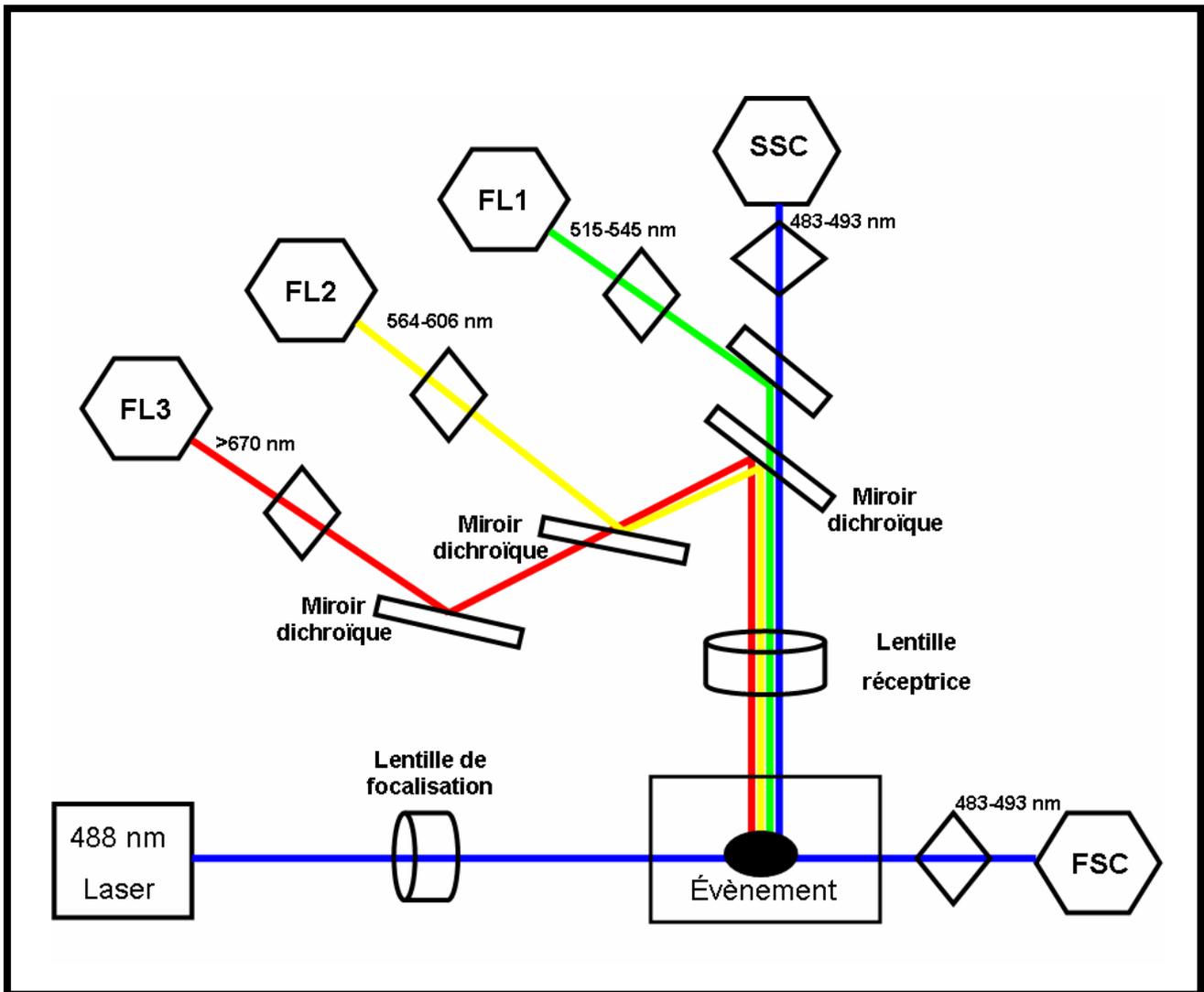


Figure II.3 : Schéma conceptuel simplifié du fonctionnement du système optique du cytomètre en flux FACSCalibur, d'après Collier (2000, Détail dans le texte)

phycocyanine). Ces signaux sont, donc, déviés et sélectionnés par des miroirs dichroïques et des filtres spécifiques avant d'être récoltés par le photomultiplicateur qui traduit le signal lumineux en un signal électronique.

Les acquisitions ont été menées en utilisant un débit élevé ($90 \mu\text{l.mn}^{-1}$ en moyenne) pour compter les organismes autotrophes, sans adjonction d'aucun fixateur ou colorant, ou avec un débit moyen ($49 \mu\text{l.mn}^{-1}$ en moyenne) pour compter les bactéries hétérotrophes et les virus, préalablement fixés, dilués dans du TE puis marqués avec du SYBR Green I (Molecular probes). Il est important de noter ici que le débit a été vérifié pour chaque série d'analyses. Les données obtenues sont représentées sous forme monoparamétrique (histogramme) ou biparamétrique (cytogramme) permettant d'apprécier la distribution des différentes populations sur la base de leur niveau de fluorescence et de « taille » (**Figure II.4**). Après transfert des fichiers, l'analyse a été réalisée au moyen du logiciel CYTOWIN (Vaulot, 1989) disponible gratuitement à <http://www.sbroscoff.fr/Phyto/cyto.html#cytowin>

II.4.1.2. Protocole de préparation et d'analyse des échantillons

La préparation des échantillons pour l'analyse en cytométrie a été réalisée suivant les protocoles décrits dans *Marie et al. (1999, 2000)*. Pour l'analyse de la fluorescence naturelle destinée à déterminer l'abondance des cellules riches en pigments chlorophylliens, phycoérythrine ou phycocyanine (i.e le phytoplancton), $1 \mu\text{l}$ d'une solution diluée de microbilles sphériques de $1 \mu\text{m}$ (Polysciences) a été rajouté à 1 ml de l'échantillon brut.

L'acquisition a été faite pendant 3 à 4 minutes. Contrairement au phytoplancton, les bactéries et les virus ne présentent pas de fluorescence naturelle. Chaque échantillon a d'abord été fixé au glutaraldehyde à 1% de concentration finale pendant environ 20 minutes, puis dilué ($5 \mu\text{l}$ d'échantillon) dans une solution contenant $490 \mu\text{l}$ de TE autoclavé et filtré à travers $0,02 \mu\text{m}$ et $0,5 \mu\text{l}$ de microbilles, et enfin marqué avec $2,5 \mu\text{l}$ du fluorochrome SYBR Green I dilué au 1/100. Le tout a été chauffé à 75°C pendant 10 mn pour optimiser le signal (*Duhamel et al., 2006*).

II.4.2. Etude de la structure de la communauté bactérienne

La composition et les modifications de structure de la communauté bactérienne pour les lacs Lemans et d'Annecy ont été déterminées par la méthode dite TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification - Fluorescent *In Situ* Hybridization)

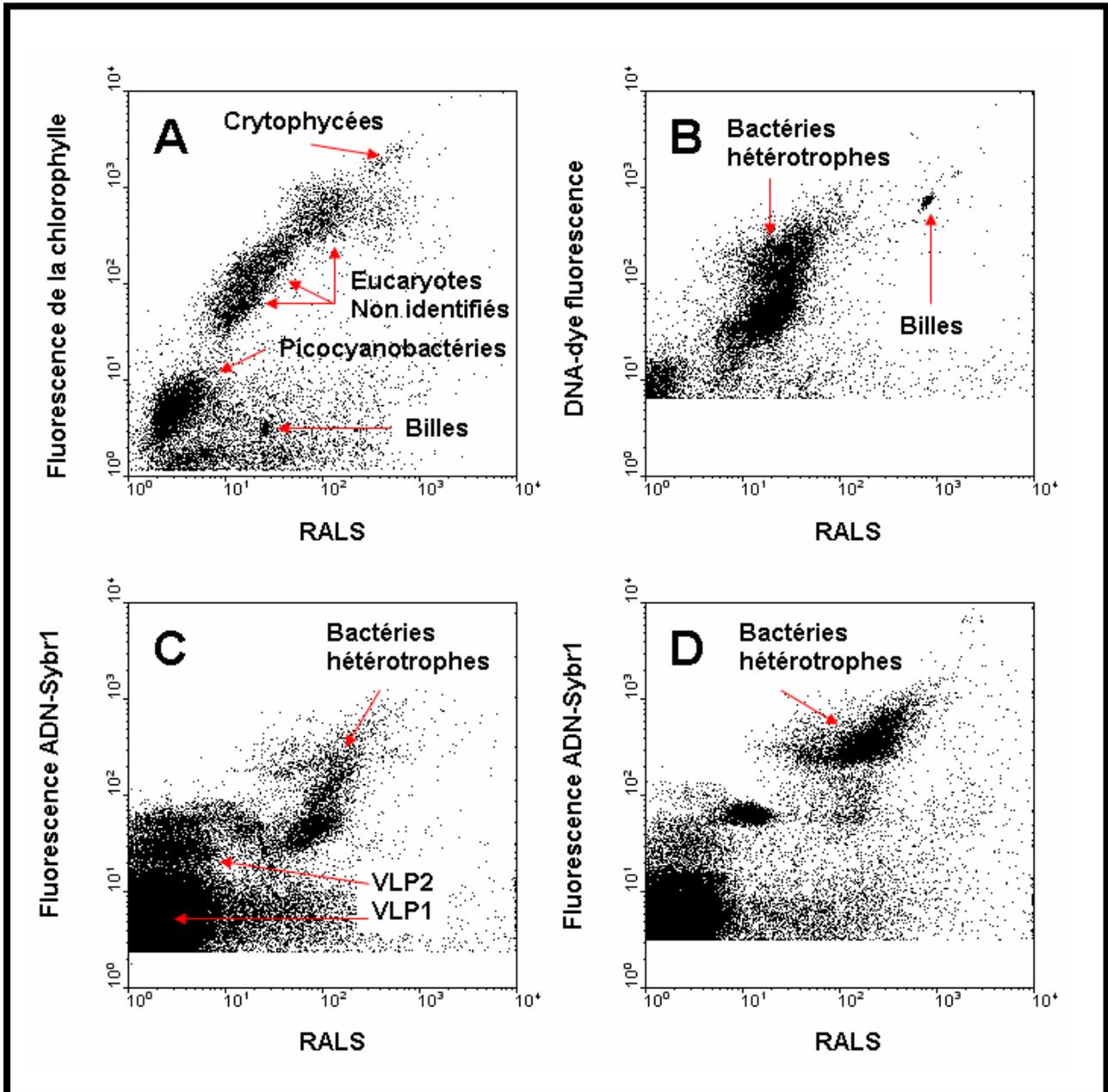


Figure II.4 : Représentation biparamétrique des différents événements détectés par le cytomètre en flux FACSCalibur. VLP : Virus-Like-Particles.

II.4.2.1. Principe de la méthode TSA-FISH

La technique FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) permet la détection de micro-organismes cultivables ou non cultivables, avec pour principal intérêt la distinction de groupes phylogénétiques divers à l'intérieur d'un assemblage parfois complexe de micro-organismes. Cette méthode permet par exemple dans notre cas la visualisation de groupes bactériens ciblés parmi l'ensemble des bactéries hétérotrophes. Le principe est la détection de séquences d'acides nucléiques à l'aide d'une sonde oligonucléotidique qui est associée à un fluorochrome. La sonde va s'hybrider de manière spécifique à la séquence cible complémentaire à l'intérieur de la cellule bactérienne intacte. Les cellules ayant fixé la sonde fluorescente sont ensuite révélées par observation en microscopie à épifluorescence. Le protocole classique de la méthode FISH comporte généralement 4 étapes : la fixation et la perméabilisation de l'échantillon, l'hybridation, les étapes de lavage afin d'éliminer les sondes non hybridées et la détection des sondes hybridées à l'intérieur des cellules à l'aide de la microscopie à épifluorescence (**Figure II.5**).

Les sondes oligonucléotidiques utilisées pour la détection des groupes bactériens ciblent généralement des séquences de l'ARNr 16S ou 23S. Constitutives de la petite et de la grande sous-unité des ribosomes, les ARNr 16S et 23S sont des éléments clés présentant de nombreuses caractéristiques intéressantes les imposant comme référence de la taxonomie moléculaire chez les procaryotes. Ces deux macromolécules sont présentes en quantité très importante dans toutes les cellules bactériennes et aucun transfert de gène n'a été observé entre les différents genres bactériens (principal intérêt de l'ARNr 16S et 23S comme index de phylogénie moléculaire). Elles sont composées de régions très conservées permettant de déterminer les relations entre les différents groupes bactériens et des régions hypervariables intervenant dans l'identification des séquences dites signatures caractéristiques d'ordre taxonomique différent (espèce, genre, famille,...).

La technique FISH repose sur le principe de l'hybridation moléculaire. Cette dernière désigne l'association qui peut avoir lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires et qui induit la formation d'un double brin. L'association s'effectue par l'établissement de liaisons hydrogènes spécifiques : deux liaisons entre l'adénine (A) et l'uracile (U) (ou la thymine (T) pour l'ADN) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). L'hybridation est à la base de nombreuses techniques en biologie moléculaire impliquant la mise en présence de deux brins simples d'acides nucléiques dans des conditions physico-chimiques précises. Le brin dont on connaît au moins une partie de la séquence est

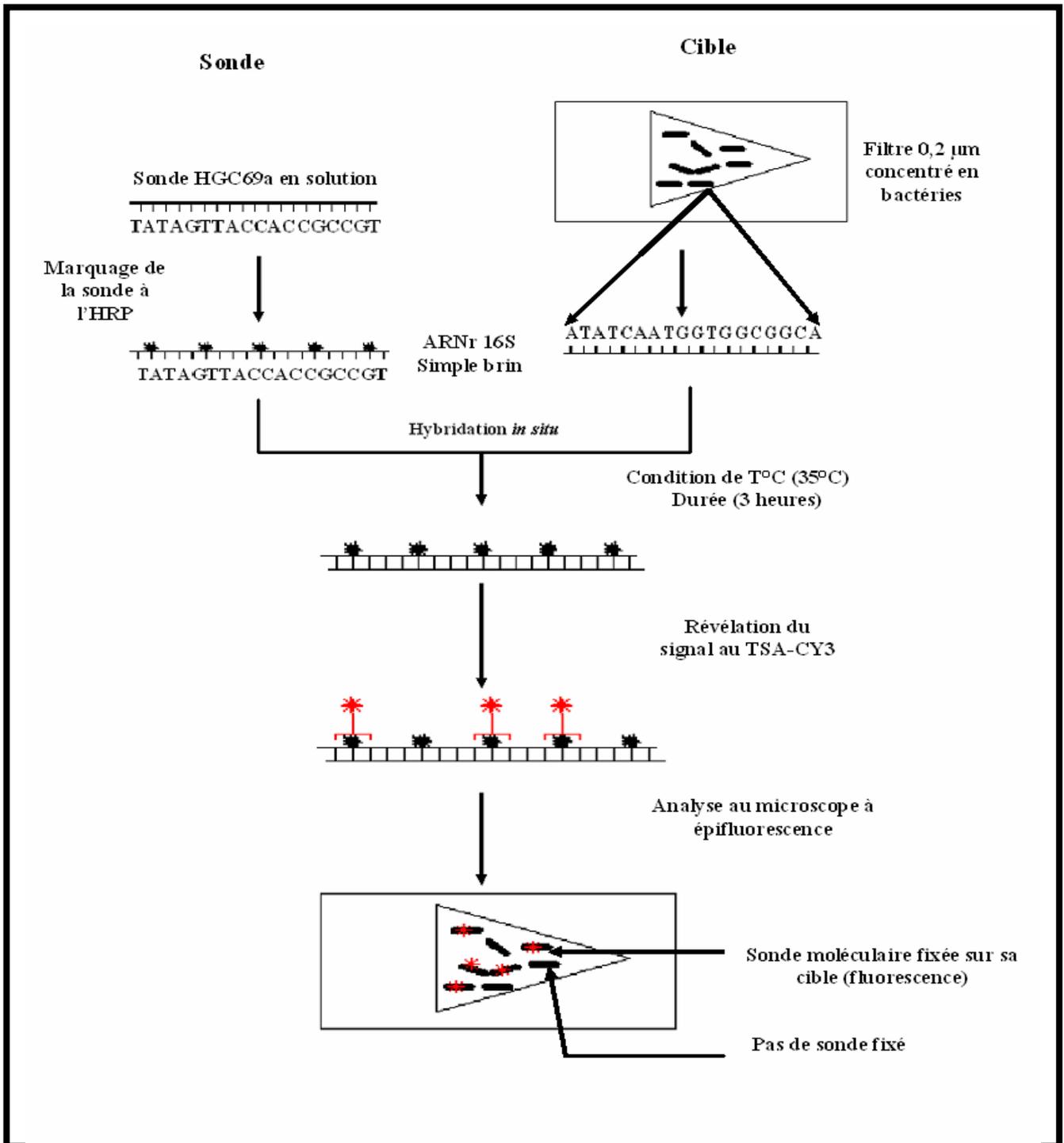


Figure II.5 : Schéma résumant succinctement les grandes étapes de préparation des échantillons par la méthode d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH, voir texte pour plus de détail).

une sonde, l'autre brin (celui que l'on souhaite caractériser) constitue la cible. Les sondes utilisées sont généralement constituées de 15 à 30 oligonucléotides, et dans la technique classique, ces sondes sont associées à un fluorochrome qui peut être de la fluorescéine, des carbocyanines (CY3, CY5) ou encore, la tetraméthyl rhodamine. Récemment il a été démontré que la sensibilité de la méthode pouvait être significativement améliorée grâce à une amplification enzymatique du signal fluorescent telle que la technique TSA (Tyramide Signal Amplification). Les sondes oligonucléotidiques sont dans ce cas associées à la peroxydase du raifort (HRP) qui utilise la tyramide-fluoresceine ou tyramide-CY3 comme substrat.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé cette méthode d'amplification du signal et non la méthode classique. Nous avons donc ciblé les molécules ARNr 16S et 23S présentes dans les cellules bactériennes à l'aide de sondes nucléotidiques spécifiques associées avec la HRP (*Amann et al., 1992 ; Bobrow et al., 1989*), une enzyme d'environ 40 KDa, et du système d'amplification TSA (*Lebaron et al., 1997 ; Pernthaler et al., 2002*), ce qui nous a permis de « booster » le signal de fluorescence des cellules hybridées de 10 à 20 fois comparativement aux sondes monomarquées au fluorochrome indocarbocyanine dye cyanine 3 (CY3, **Figure II.5**).

Le choix des sondes a été fait en essayant de cibler un maximum de diversité au sein de la communauté bactérienne parmi les groupes les plus représentatifs, à savoir les Eubactéries, les Actinobacter, les α -protéobactéries, les β -protéobactéries et les *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. La liste des sondes et leurs caractéristiques principales sont données dans le Tableau II.1.

II.4.2.2. Traitement et préparation des échantillons

Lors du prélèvement, les échantillons d'eau ont été fixés au para-formaldéhyde (PFA) à 4% de concentration finale et ont été mis à incuber 4 heures à 4°C. À l'aide d'une tourelle, 10 ml de chaque échantillon ont été filtrés à travers un filtre en polycarbonate de porosité 0,2µm (filtre millipore GTTP de diamètre 25 mm,) posé sur un préfiltre. Après filtration de l'échantillon, les filtres ont été rincés avec 2 ml de tampon de phosphate salin (PBS, constitué de 130 mM de phosphate de sodium à pH 7,2). Les filtres subissent ensuite 3 bains d'alcool successifs, à l'aide de 2 ml d'éthanol à 50%, puis 80% et enfin à 100% pendant 3 mn. Après séchage, les filtres ont été conservés à -20°C jusqu'à hybridation.

Tableau II.1 : Caractéristiques principales des sondes oligonucléotidiques utilisées dans le cadre de cette étude

Sonde	Spécificité	Séquence (5'-3') de la sonde	Site ciblé (position ARNr)	%FA in situ ^a	Références
HGC69a	Actinobacteria	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	23S (1901-1918)	20	<i>Stahl et Amann (1991)</i>
ALF968	α -Protéobactéries	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	16S (968-986)	20	<i>Neef (1997)</i>
BETA42a	β -Protéobactéries	GCC TTC CCA CTT CGT TT	23S (1027-1043)	35	<i>Manz et al. (1992)</i>
CF319a	<i>Cytophaga-flavobacterium</i>	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	16S (319-336)	35	<i>Manz et al. (1996)</i>

*la concentration de formamide utilisé dans l'hybridation in situ pour chacune des sondes.

Pour réaliser l'hybridation, les filtres ont été préalablement découpés en quarts, permettant à partir du même filtre de réaliser 4 marquages. Pour chaque quart de filtre 4 μl de sonde marquée à l'HRP (à 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de concentration) ont été ajoutés à 36 μl de tampon d'hybridation. Le mélange a ensuite été déposé sur les morceaux de filtre, le tout déposé sur une lame parafilmée placée dans une chambre d'hybridation. Environ 1 ml de tampon d'hybridation (sans sonde oligonucléotidique) a alors été déposé dans les chambres d'hybridation, (dans les puits prévus à cet effet), ce qui permet de maintenir des conditions d'humidité satisfaisantes pendant toute la durée de l'hybridation. Le tampon d'hybridation a été préparé à l'avance. Il était constitué de formamide (20% v/v pour les sondes ARCH 915 et ALF 968, 35% v/v pour les autres sondes), 0,9 mM de NaCl, 20 mM de TRIS, du sodium dodecyl sulfate (SDS, 0,01% de concentration finale) et enfin 10% d'agent bloquant.

L'hybridation s'est déroulée dans une étuve à 35°C pendant une durée de 3 heures. Les sondes qui ne se sont pas hybridées sont éliminées par deux rinçages successifs de 20 minutes chacun dans 10 ml de tampon de rinçage (56 mM NaCl, 5 mM d'acide éthylène diaminotétra acétique (EDTA), 0,01% SDS et du TRIS de 20 mM) présentant la même astringence (conditions expérimentales de température, de pH et de force ionique permettant l'hybridation moléculaire) que le tampon d'hybridation.

L'étape suivante est la réaction enzymatique entre HRP et TSA permettant à posteriori la révélation du signal de fluorescence des cellules bactériennes marquées. Pour cela, les quarts de filtres séchés et déposés sur des lames parafilmées ont été recouverts par 30 μl de la solution contenant le TSA. Cette solution était constituée d'un mélange de dextrane sulfate (DS) et de diluant d'amplification (AD) (un volume de DS à 40% pour un volume de AD) auquel était ajouté le TSA-CY3 (un volume de CY3-tyramide pour 50 volumes de solution de mélange DS+AD). Des incubations en chambre humide pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité sont alors effectuées. Le fluorochrome non marqué a été éliminé par deux rinçages successifs de 20 minutes chacun à 55°C dans 10 ml de tampon TNT (Tris 0,1M pH 7,5, NaCl 0,15 mM, Tween 20)

Un double marquage avec le DAPI a été effectué afin d'accéder à la totalité de l'abondance bactérienne. Dans ce but, les sections de filtres ont été séchées, placées sur une lame et recouvertes d'une solution de DAPI pendant 10 minutes, puis rincées à l'éthanol (70%).

Les filtres séchés ont été montés entre lame et lamelle dans l'huile cytifluor et sont observés dans les plus brefs délais (quelques heures) au microscope à épifluorescence sous lumière verte spécifique du CY3. Le comptage a été réalisé à l'aide un microscope Eclipse

Nikon équipé d'un bloc composé d'un filtre d'excitation de 550 à 570 nm et d'un filtre d'arrêt à 420 nm relié à une caméra numérique Nikon (DMX1200) qui a permis la prise de champ en configuration FISH par l'intermédiaire du logiciel LUCIA, 50 champs ont ainsi été enregistrés numériquement. Le nombre de bactéries marquées par millilitre a été déterminé en appliquant la règle de calcul suivante :

$$N = (x * S_f) / (S_c * v)$$

Soit :

N : nombre de bactéries.ml⁻¹; **X** : nombre de bactéries par champ; **S_f** : surface de filtration; **S_c** : surface du champ; **V** : volume filtré (ml).

II.4.3. Analyses des paramètres chimiques

Les différents paramètres chimiques qui ont été pris en considération pour cette expérience sont :

1. Les composés carbonés représentés par : Carbone Organique Dissous (COD), Carbone Organique Total, Titre Alcalimétrique Complet (TAC) et l'Indice d'Aromaticité (I.A.) ;
2. Les composés azotés : Azotes minérales (Nitrate (NO₃²⁻), Nitrite (NO₂⁻) et ammonium (NH₄⁺) et l'azote total (N_{total}) ;
3. Les composés phosphatés : phosphate minéral (PO₄³⁻) et le phosphate total (P_{total}).

Ils ont été mesurés par le laboratoire de chimie analytique de la station hydrobiologique de Thonon-Les-Bains (pour ce qui concerne le COD). Les principes de dosage de ces différents éléments sont présentés en **Annexe II**.

II.5. Analyse statistique

Afin de rendre compte des différences significatives entre les traitements contrôles et enrichis, dans le cas des triplicats., l'analyse statistique utilisée au cours de cette étude est le test non paramétrique de Mann et Whitney (test U)

III.1. Conditions initiales au point de prélèvement du lac Léman et d'Annecy

Les différentes caractéristiques chimiques et biologiques de l'eau prélevée dans les deux lacs aux points de prélèvements SHL2 et GL (station de référence pour le suivi des lacs) sont résumées sur les **Tableaux III.1** et **III.2** ainsi que la **figure III.1**. Elles permettent, d'une part, d'avoir une idée générale sur les conditions initiales des différents paramètres au temps 0 pour chacune des expérimentations (après filtration à travers 11 μm et 1,2 μm) avant l'enrichissement en particules virales et de comparer d'autre part, les paramètres environnementaux des deux lacs à une même période de l'année.

III.1.1. Lac Léman

Les différents paramètres chimiques mesurés dans les échantillons prélevés au début du mois de mars 2006, indiquent que dans le lac Léman, l'azote minéral est dominé à 98% par les nitrates (NO_3^{2-}) ce qui représente 74% en azote total, pour une concentration de l'ordre de $0,15 \text{ mgN.l}^{-1}$. Le phosphore total est représenté à plus de 84% par les orthophosphates PO_4^{3-} ($20.10^{-3} \text{ mgP.l}^{-1}$). Les valeurs de COD sont relativement faibles ($1,01 \text{ mgC.l}^{-1}$) par rapport à celles mesurées à la même période sur le Lac du Bourget de même niveau trophique ([COD] variant de 1,85 à $2,10 \text{ mgC.L}^{-1}$).

Quelque soit la fraction considérée (< 11 et/ou $< 1,2 \mu\text{m}$), le compartiment biologique le plus important en terme de densité est représenté par les virus (abondance pour les 2 groupes viraux dans la fraction $< 11 \mu\text{m}$: $4,3.10^6 \text{ particules.ml}^{-1}$, **Tableau III.1**), suivis des bactéries hétérotrophes (de l'ordre de $5.10^5 \text{ cellules.ml}^{-1}$ dans la fraction $< 11 \mu\text{m}$). Ces concentrations ne sont pas significativement différentes entre les deux fractions (< 11 et $< 1,2 \mu\text{m}$, test U, $p\text{-value} = 0,591$, $\alpha = 0,5$). L'abondances des flagellés hétérotrophes est proche de $3.10^2 \text{ cell.ml}^{-1}$, ce qui représente pour le lac Léman une valeur d'abondance relativement modeste puisque l'étude de la dynamique saisonnière met en évidence des abondances pouvant aller jusqu'à $5.10^4 \text{ cell.ml}^{-1}$ durant la période de estivale. L'efficacité de filtration à travers le filtre de porosité 1,2 μm est satisfaisant puisqu'il permet dans la fraction $< 1,2 \mu\text{m}$ d'éliminer 92% des flagellés hétérotrophes (**Tableau III.1**).

L'utilisation des quatre sondes (HGC, ALF 968, BETA 968 et CF 319a) afin de cibler les principaux groupes bactériens présents dans le lac Léman a permis de marquer entre 65 % et 93% des bactéries dénombrées en DAPI (**Tableau III.2**). Parmi ces quatre groupes, les α -

Tableau III.1 : Conditions initiales (t_0) des paramètres chimiques et biologiques au point de prélèvement du lac Léman (SHL2) et du lac d'Annecy (GL), le 06 et 13 mars 2006 respectivement. PEA: picoplancton eucaryote; PErich: Cryptophycés ou cyanobactéries filamenteuses riches en phycoérythrine.

Lacs		Léman		Annecy	
Fractions (μm)		<11	<1,2	<11	<1,2
Paramètres biologiques	Bactéries hétérotrophes (cell.ml^{-1})	$4,76 \cdot 10^5$	$3,67 \cdot 10^5$	$1,52 \cdot 10^6$	$9,24 \cdot 10^5$
	Flagellés hétérotrophes (cell.ml^{-1})	293	24	253	22
	Virus 1 (part.ml^{-1})	$3,55 \cdot 10^6$	$2,90 \cdot 10^6$	$6,86 \cdot 10^7$	$2,84 \cdot 10^7$
	Virus 2 (part.ml^{-1})	$7,68 \cdot 10^5$	$7,11 \cdot 10^5$	$1,49 \cdot 10^6$	$1,37 \cdot 10^6$
	<i>Synechococcus sp.</i> (cell.ml^{-1})	396	42	8910	12
	PEA (cell.ml^{-1})	200	8	1087	1
	PErich (cell.ml^{-1})	133	0	136	0
Paramètres chimiques	COD (mgC.l^{-1})	1,02	0,99	1,62	1,65
	Ammonium (NH_4^+ , mgN.l^{-1})	$7 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
	Nitrite (NO_2^- , mgN.l^{-1})	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
	Nitrate (NO_3^{2-} , mgN.l^{-1})	$54 \cdot 10^{-2}$	$56 \cdot 10^{-2}$	$15 \cdot 10^{-2}$	$21 \cdot 10^{-2}$
	Azote total (mgN.l^{-1})	$74 \cdot 10^{-2}$	$80 \cdot 10^{-2}$	$29 \cdot 10^{-2}$	$30 \cdot 10^{-2}$
	Orthophosphate (PO_4^{3-} , mgP.l^{-1})	$20 \cdot 10^{-2}$	$21 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$
	Phosphore totale (mgP.l^{-1})	$26 \cdot 10^{-3}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$

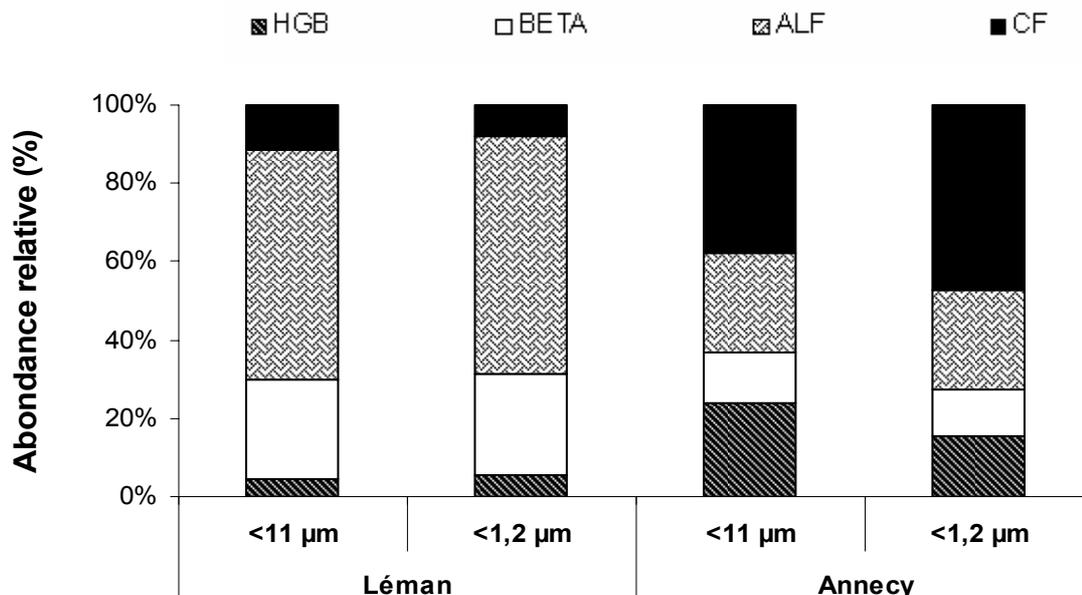


Figure III.1: Abondance relative de chaque groupe bactérien par rapport à l'abondance obtenue pour le total des quatre sondes avec, HGC : Actinobactéries, BETA : β -Protéobactéries, ALF : α -Protéobactéries, CF : *Cytophaga-Flavobacterium*.

Tableau III.2 : Abondances initiales (t_0) des 4 groupes bactériens marqués par la méthode FISH pour les expérimentations lac Léman (SHL2) et du lac d'Annecy (GL), le 06 et 13 mars 2006 respectivement – Pourcentage de bactéries marquées par la méthode FISH avec ces 4 sondes par rapport aux cellules bactériennes marquées au DAPI.

Lacs		Léman		Annecy		
Abondance bactérienne (cell.ml ⁻¹)	Sondes	<11 µm	<1,2 µm	<11 µm	<1,2 µm	
Eubactéries	Actinobactéries	HGC69a	1,36.10 ⁴	1,46.10 ⁴	5,38.10 ⁴	1,13.10 ⁴
	α -Protéobactéries	ALF968	1,59.10 ⁴	1,60.10 ⁴	5,79.10 ⁴	1,96.10 ⁴
	β -Protéobactéries	BETA968	6,74.10 ⁴	6,72.10 ⁴	2,92.10 ⁴	8,55.10 ⁴
	<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	CF319a	3,07.10 ⁴	2,14.10 ⁴	8,50.10 ⁴	3,42.10 ⁴
% de bactéries marquées FISH / DAPI			92,58%	64,30%	39,11%	43,05%

Protéobactéries sont les plus représentées à 58,8% dans la fraction <1,2 µm et à 60,6% dans la fraction <1,2 µm, alors qu'avec une abondance relative de 5,56% et de 4,65%, toujours dans les deux fractions respectivement, les Actinobactéries constituent le groupe le moins abondant (**Figure III.1**).

III.1.2. Lac d'Annecy

Suivant le **Tableau III.1**, les nitrates (NO₃⁻) constituent la forme azotée dominante à 98% et 52% de l'azote inorganique total et de l'azote total respectivement. Avec une concentration de 1.10⁻³ mgP.l⁻¹, les orthophosphates PO₄³⁻ représentent 85% du phosphore total présent dans l'eau durant cette période. Le COD présente une concentration de 1,65 mgC.l⁻¹.

Comme pour le Léman, les virus demeurent le compartiment biologique le plus abondant (abondance des 2 groupes viraux dans la fraction <11µm : 7 10⁷ particules.ml⁻¹), toutefois, cette abondance virale est significativement plus élevée que celle présente dans l'échantillon d'eau du lac Léman.

Les bactéries hétérotrophes présentent également des abondances plus élevées que celles observées pour le lac Léman à l'occasion des ces expérimentations, toutefois à une échelle pluriannuelle, les abondances moyennes pour les bactéries hétérotrophes sont globalement plus élevées dans l'épilimnion du lac Léman que dans celui d'Annecy (*Personnic et al., en révision*)

On observe une perte significative de bactéries hétérotrophes suite à la filtration sur maille 1,2 µm (test U, *p-value* < 0,05, $\alpha = 0,5$), en effet, seulement 61% de l'abondance initialement présente dans la fraction <11 µm est conservée dans la fraction <1,2 µm, alors que près de 80% était conservée pour l'échantillon lémnique. Au temps t₀ de l'expérimentation, l'utilisation des quatre sondes n'a permis de marquer que 39,11% et 43,05% du total des bactéries dénombrées en DAPI (**Tableau III.2**). En comparaison avec ce qui a été observé pour le lac Léman, la structure bactérienne est sensiblement différente dans le lac d'Annecy (**Figure III.1**). Les *Cytophaga-Flavobacterium*, faiblement représentées dans les échantillons du lac Léman, constituent ici le groupe bactérien dominant représentant 37,6% et 47% du total des bactéries marquées par les quatre sondes dans les fraction <11 µm et <1,2 µm. Les abondances relatives les plus faibles ont été dénombrées pour le groupe des β-Protéobactéries.

Les valeurs d'abondances des flagellés hétérotrophes sont très proches de celles observées pour le lac Léman (2,5.10² cell.ml⁻¹ dans la fraction <11 µm). Par ailleurs

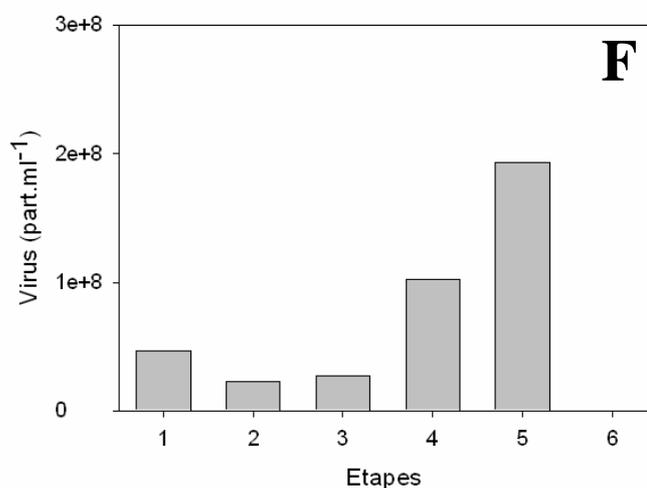
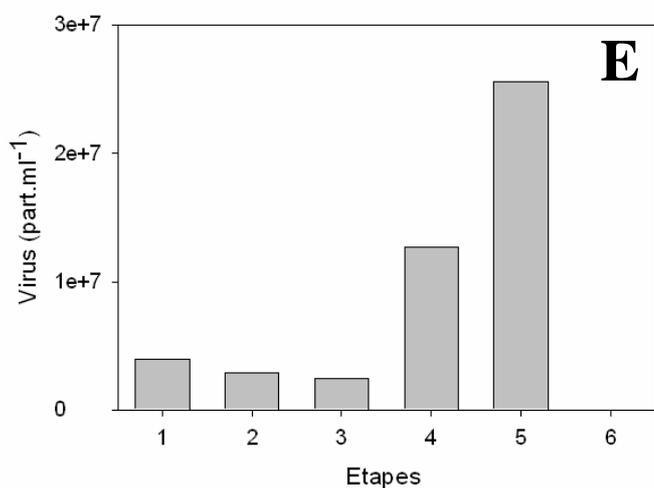
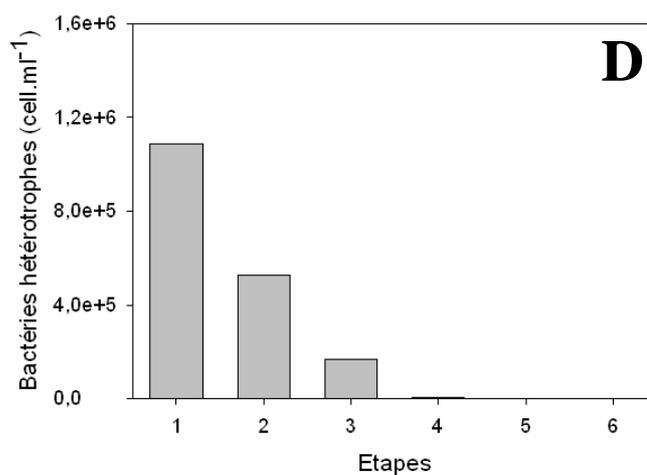
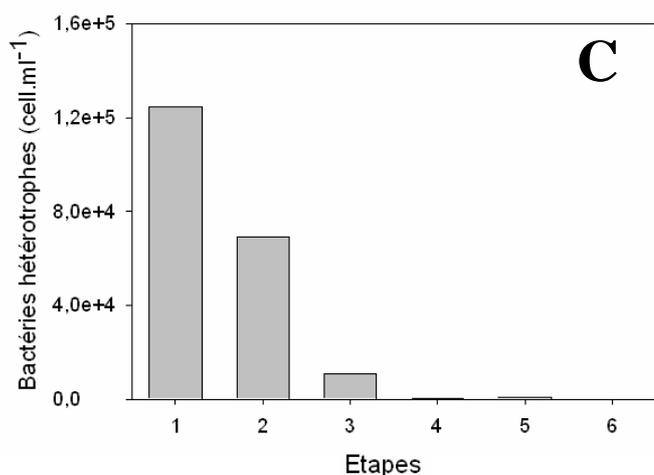
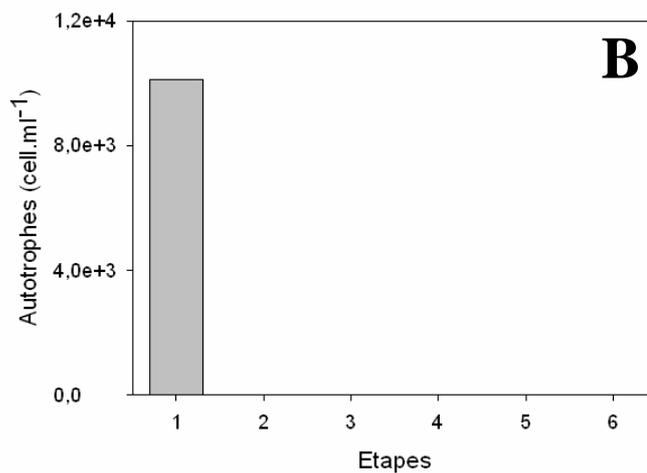
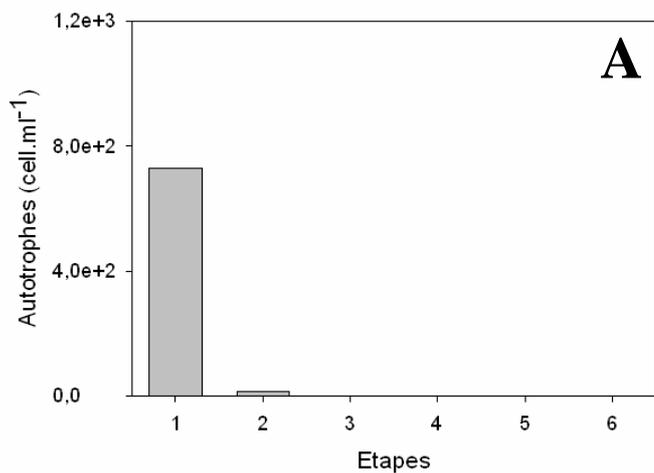
LE**AN**

Figure III.2 : Evolution de la concentration des autotrophes (A et B), des bactéries hétérotrophes (C et D) et des virus (E et F) en fonction des différentes étapes de filtration: Echantillon brut (1), filtration GF/F (2), filtration 0,2 μm (3), ultrafiltration (4), centrifugation pour le culot (5) et le surnageant (6), pour le lac Léman (LE) et le lac d'Annecy (AN).

l'efficacité de la filtration est similaire entre les lacs Léman et d'Annecy, puisque plus de 91% des flagellés hétérotrophes sont éliminés dans la fraction considérée sans prédateur (fraction <1,2 μm).

D'une manière générale, des différences marquées apparaissent très clairement entre les paramètres chimiques et/ou biologiques caractéristiques du lac Léman et du lac d'Annecy, notamment en ce qui concerne les teneurs en phosphates (plus faibles au lac d'Annecy), mais également de manière moins attendue pour l'abondance des microorganismes (particulièrement des virus, et des bactéries hétérotrophes) qui est moins élevée dans le cas du lac Léman (mésotrophe).

III.2. Expériences d'enrichissement

III.2.1. Tests méthodologiques

La réalisation de l'expérience d'enrichissement nécessitait l'obtention d'un concentrât viral suffisamment riche. Il était donc important de vérifier l'efficacité et le rendement des différentes étapes de préparation de ce concentrât. Les résultats présentés sur la **Figure III.2** ont été obtenus par analyse en cytométrie en flux.

On observe, après filtration à travers les filtres GFF et 0,2 μm , une élimination totale des autotrophes, accompagnée d'une baisse significative de la communauté bactérienne hétérotrophe de 77% pour le lac Léman et de 65% pour celui d'Annecy, ainsi qu'une perte des virus de 1,4 fois et de 1,7 fois seulement, pour chacun des deux lacs, respectivement.

L'étape de centrifugation a ensuite permis d'augmenter la concentration virale 8 et 5 fois par rapport aux échantillons bruts prélevés dans lac Léman et d'Annecy. Cette augmentation aurait été seulement de 4 et 3 fois (respectivement) après l'ultrafiltration. Il est donc apparu clairement que, la centrifugation finale est une étape efficace dans l'augmentation de la concentration en particules virales.

III.2.2. Evolution des communautés microbiennes au cours des expériences

III.2.2.1. Dynamique de la communauté phytoplanctonique détectée en cytométrie

Au moyen de la cytométrie en flux, trois communautés autotrophes ont pu être discriminées (**Figure III.3**) (d'après *Crosbie et al. (2003)*): les picocyanobactéries riches en phycoérythrine du genre *Synechococcus sp.* (A et B), les petits eucaryotes (PEA) (C et D) et les PErich (regroupant uniquement les eucaryotes riches en phycoérythrine et les cryptophycées) (E et F).

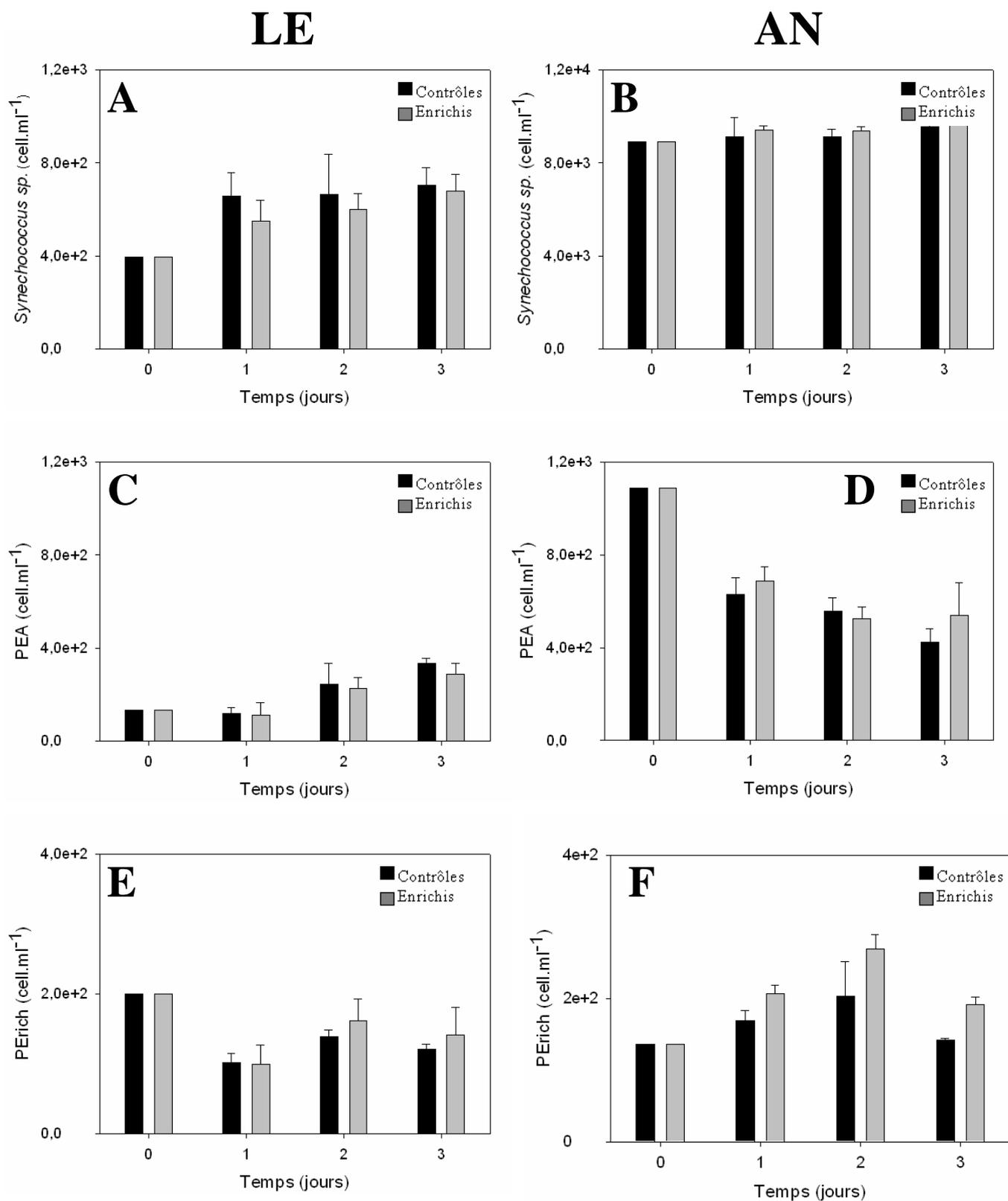


Figure III.3 : Evolution temporelle de l'abondance des différents groupes autotrophes (*Synechococcus sp.* (A et B), Eucaryote (C et D) et PERich (E et F) dans la fraction <math>< 11 \mu\text{m}</math>, au cours de chacune des expériences menées pour le lac Léman (LE) et le lac d'Annecy (AN).

Le suivi de l'abondance des *Synechococcus sp.* (**Figure III.3 A et B**) met en évidence, quelque soit le lac considéré, une légère augmentation d'abondance, au cours du temps. Cependant, aucune différence significative (test U, $p\text{-value} = 0,924$, $\alpha = 0,5$) n'est observée entre les traitements enrichis et contrôles.

Une évolution temporelle contrastée, en fonction des lacs, est observée pour les eucaryotes pigmentés (Figure III.3 C et D). Elle se traduit par une augmentation de l'abondance pour l'expérimentation du lac Léman et par une baisse de celle-ci pour le lac d'Annecy, atteignant des valeurs de l'ordre de 4.10^2 et 7.10^2 cellules.ml⁻¹, 72 heures après incubation des bouteilles.

Le groupe des PErich présente (Figure III.3 E et F) une évolution sensiblement identique. Comme pour les *Synechococcus sp.*, aucune différence (test U, $p\text{-value} = 0,478$, $\alpha = 0,5$) n'apparaît en fonction de l'enrichissement en virus, pour les deux lacs Léman et d'Annecy.

Très peu d'individus de *Synechococcus sp.* sont présents dans la fraction $<1,2 \mu\text{m}$ des deux lacs (**Annexe III**) et aucune évolution n'a été enregistrée. Les eucaryotes et PErich sont totalement absents de cette fraction durant toute l'expérience.

III.2.2.2. Dynamique de la communauté virale

On distingue à partir de l'analyse cytométrique, deux communautés virales (**Figure III.4 et III.5**) : VLP1 «Virus-Like-Particles 1» et VLP2 «Virus-Like-Particles 2», pouvant correspondre respectivement et d'après Marie et al. (1999), aux phages bactériens hétérotrophes et autotrophes.

Dans le cas du lac Léman, l'enrichissement viral induit un doublement de la concentration des particules virales VLP1 ($8,65 \pm 4,5.10^6$ part.ml⁻¹ et de $8,69 \pm 3,8.10^6$ part.ml⁻¹, pour les fractions < 11 et $<1,2 \mu\text{m}$; **Figure III.4 C et D**). Ces concentrations se maintiennent ensuite tout au long de l'expérience.

Alors qu'aucune évolution temporelle significative n'est observée dans le cas des traitements contrôles, la concentration des VLP1 demeure relativement stable dans les deux fractions ($4,12 \pm 4,6.10^6$ part.ml⁻¹ pour la fraction $<11 \mu\text{m}$ et $3,29 \pm 2,7.10^6$ part.ml⁻¹ pour la fraction $<1,2 \mu\text{m}$). Une augmentation de ces particules virales, pour le lac d'Annecy (**Figure III.5 C et D**), est observée au bout de 24 heures d'incubation avant de se stabiliser le reste de l'expérience. En ce qui concerne l'évolution du groupe VLP2 des oscillations d'abondances sont observées au cours de l'expérience menée au Léman (**Figure III.4 E et F**). En effet, dans les traitement 'enrichis', 24 heures après l'enrichissement, on note une augmentation de leur

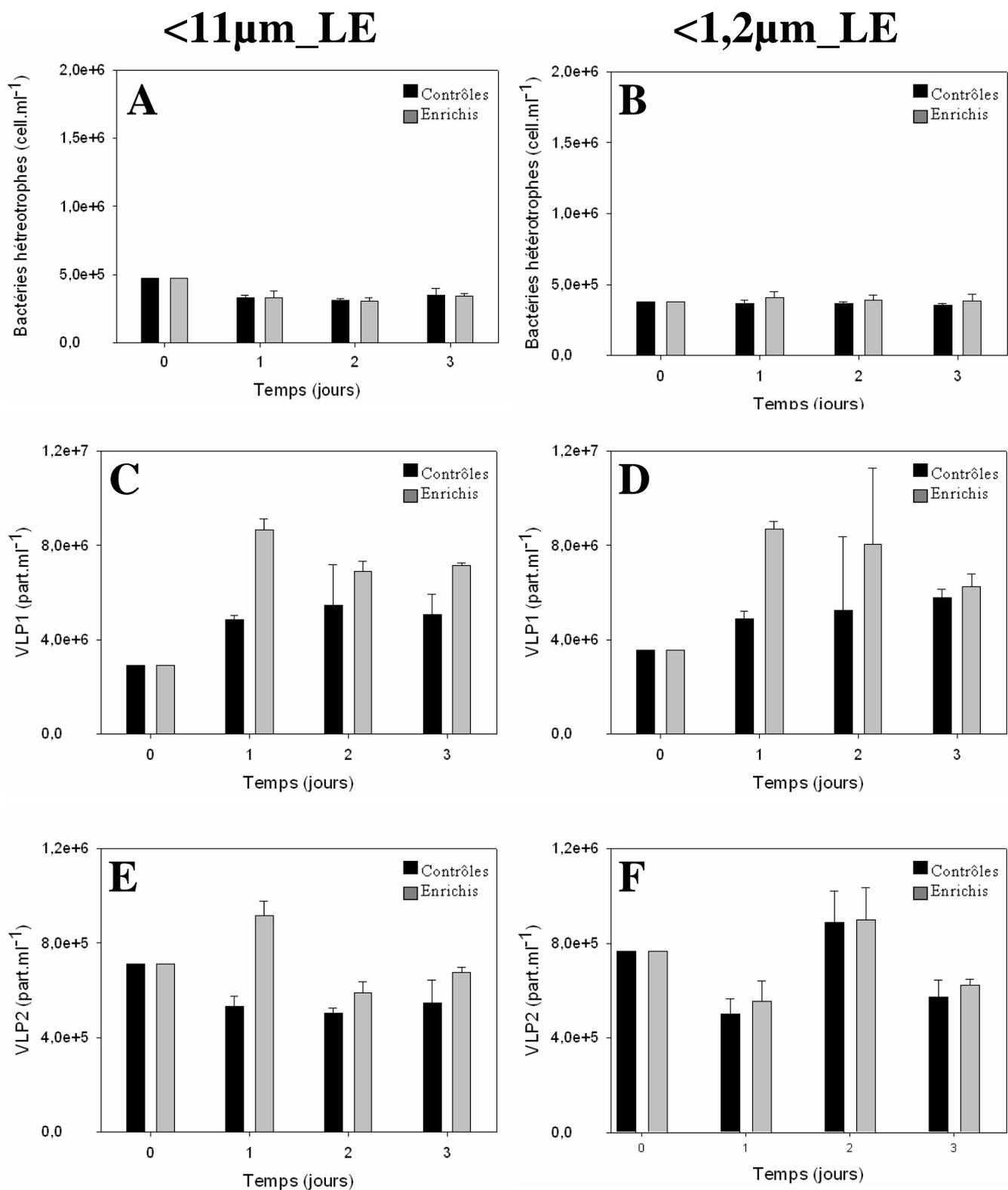


Figure III.4 : Evolution temporelle de l'abondance des bactéries hétérotrophes (A et B), des VLP1 (C et D) et VLP2 (E et F) pour la fraction $<11\mu\text{m}$ et $<1,2\mu\text{m}$ dans les traitements contrôles et enrichis pour l'expérience menée au lac Léman.

abondance dans la fraction $<11 \mu\text{m}$ ($9,1 \pm 6,2 \cdot 10^6 \text{ part.ml}^{-1}$) ainsi que dans la fraction $<1,2 \mu\text{m}$ ($8,9 \pm 8,3 \cdot 10^6 \text{ part.ml}^{-1}$). A l'inverse, en fin d'expérience (72 heures après l'enrichissement) une baisse de 30% et 25% de leur abondance est observée pour les deux fractions (<11 et $<1,2 \mu\text{m}$ respectivement). Une baisse significative apparaît également dans les traitements contrôles, 24 et 72 heures après le début de l'expérience dans les fractions $<11 \mu\text{m}$ et $<1,2 \mu\text{m}$ respectivement.

Contrairement aux résultats obtenus dans le lac Léman, les particules VLP2 restent relativement stables dans le temps durant l'expérimentation effectuée sur le lac d'Annecy (**Figure III.5 E et F**), quelque soit la fraction et/ou le traitement considéré.

III.2.2.3. Dynamique de la communauté bactérienne hétérotrophes

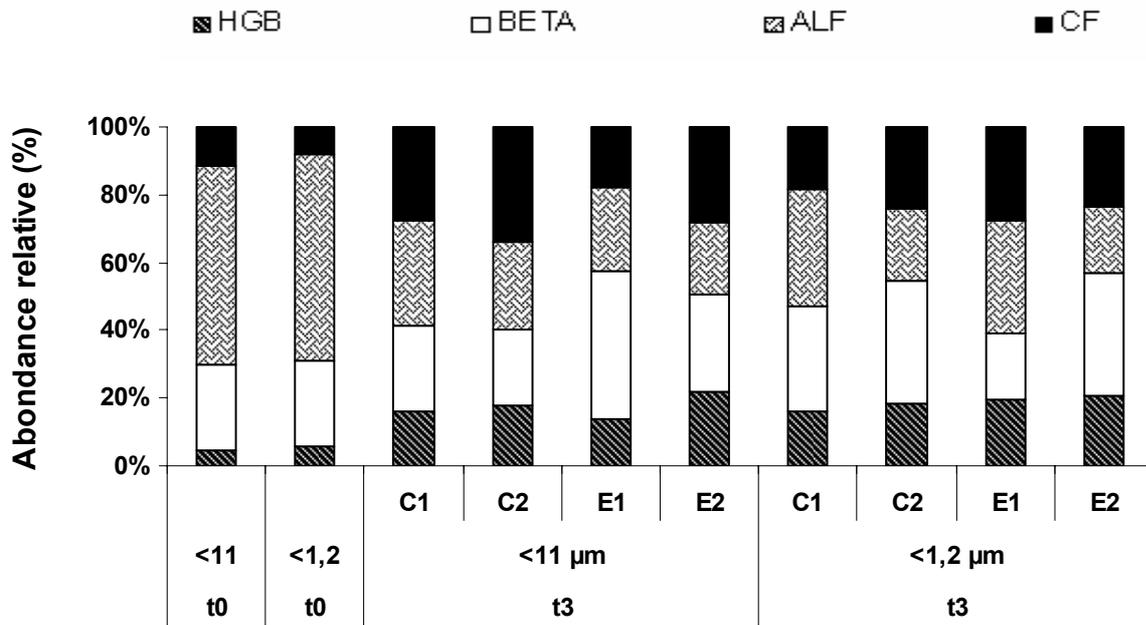
III.2.2.3.a. Evolution de l'abondance bactérienne hétérotrophe

En plus de l'analyse par cytométrie en flux (CFM), des comptages de bactéries hétérotrophes ont été réalisés par microscopie à épifluorescence (FEM) à partir des filtres destinés au marquage FISH. La comparaison des données acquises par ces deux méthodes montre que la MEF conduit à des valeurs d'abondances systématiquement plus faibles pour les bactéries hétérotrophes (Annexe III.1). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment par *Duhamel et Jacquet (2005)*. Nous ne considérons dans ce chapitre que les résultats obtenus par FCM, pour décrire l'évolution temporelle de l'abondance des bactéries hétérotrophes. Les dénombrements en microscopie après marquage au DAPI seront utilisés pour appréhender et analyser la structure des bactéries marquées par FISH, puisqu'ils ont été réalisés dans ce cadre là, afin de connaître le pourcentage de bactéries marquées par les sondes oligonucléotidiques par rapport au nombre de bactéries totales présentes sur les filtres.

L'abondance des bactéries hétérotrophes, dans les échantillons du lac Léman, ne présente pas de variation significative (test U, $p\text{-value} = 0,626$, $\alpha = 0,5$) au cours de l'expérience (**Figure III.4 A et B**), et ceci, dans le cas des deux fractions (<11 et $<1,2 \mu\text{m}$). Une différence significative (test U, $p\text{-value} < 0,05$, $\alpha = 0,5$) est cependant observée entre les traitements contrôles et enrichis de la fraction $<1,2 \mu\text{m}$, les abondances étant plus élevées dans les microcosmes contrôles.

Pour le lac d'Annecy, l'évolution temporelle des bactéries hétérotrophes (**Figure III.5 A et B**) décrit une baisse entre t_0 et t_1 dans les deux traitements de la fraction $<11 \mu\text{m}$. Alors qu'une évolution plus stable dans le temps est marquée dans ceux de la fraction $<1,2 \mu\text{m}$. Là encore, aucune différence significative (test U, $p\text{-value} = 0,13$, $\alpha = 0,5$) n'est observée entre les traitements contrôles et enrichis.

LE



AN

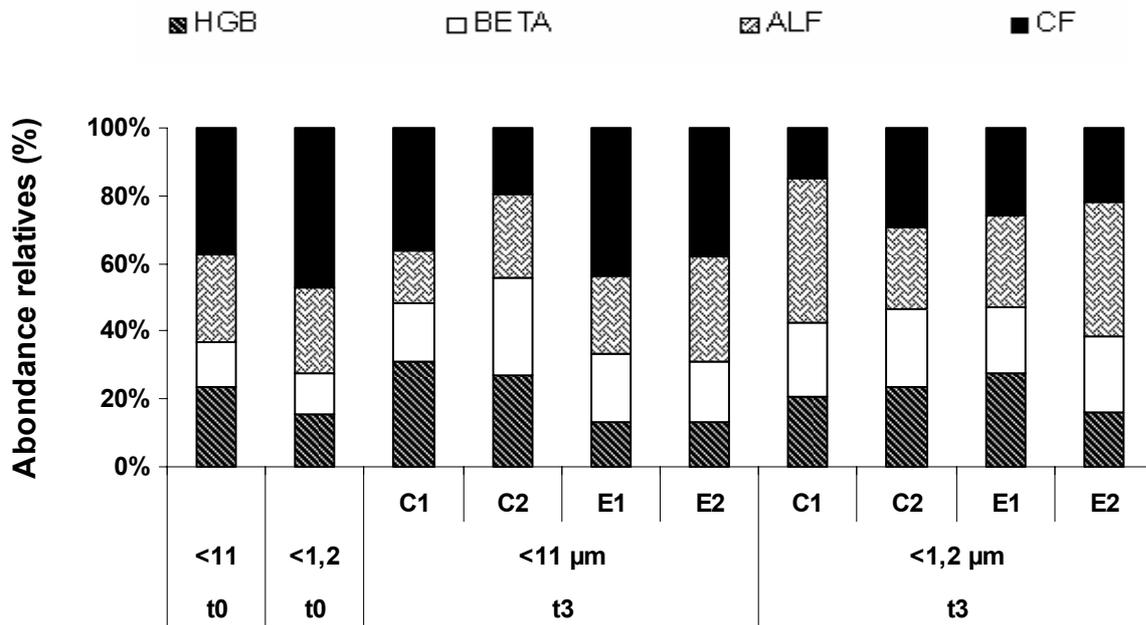


Figure III.6: Structure de la communauté bactérienne à t0 et t3 dans les traitements contrôles (C1 et C2) et enrichis (E1 et E2) des fractions <11 μm et <1,2 μm du lac Léman (LE) et lac d'Annecy (AN). HGC : actinobactéries, BET : β-Proteobactéries, ALF : α-Proteobactéries, CFB : *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroïdes*

Si l'on s'intéresse à la comparaison des fractions $<11 \mu\text{m}$ et $<1,2 \mu\text{m}$, afin de visualiser notamment l'impact de la prédation des flagellés hétérotrophes, il apparaît, pour le lac Léman, que dans les traitements contrôles, aucun effet significatif de la présence des prédateurs n'est enregistré sur l'abondance totale des bactéries hétérotrophes. En effet en présence et/ou absence de prédateurs, les taux de croissance nette des bactéries hétérotrophes entre t_0 et t_3 jours sont négatifs et de même ordre de grandeur. Toutefois, dans les microcosmes enrichis, on note une différence de ces taux de croissance bactériens en fonction de l'absence des prédateurs. En effet, un taux de croissance faible, mais positif est mesuré dans les traitements enrichis $<1,2 \mu\text{m}$ ($\mu=0.008 \text{ j}^{-1}$) tandis qu'une décroissance est mesurée dans les enrichis $<11 \mu\text{m}$.

Dans le cas du lac d'Annecy ce genre de comparaison ne permet pas de mettre en évidence d'effet régulateur de la prédation sur l'abondance totale bactérienne, les taux de croissance nette ne sont positifs dans aucune des enceintes expérimentales.

III.2.2.3.b. Evolution de la structure de la communauté bactérienne hétérotrophe

Une modification dans l'abondance des différents groupes étudiés est observée entre t_0 et t_3 . Cette modification est représentée différemment suivant le lac considéré (Léman ou Annecy) d'une part et, suivant la fraction ($<11 \mu\text{m}$ ou $<1,2 \mu\text{m}$) et/ou le traitement (contrôle ou enrichi) considérés, d'autre part.

Les résultats obtenus dans les bouteilles de la fraction $<11 \mu\text{m}$ du lac Léman (**Figure III.6**) indiquent une modification de l'importance relative des groupes bactériens, qui apparaît de manière plus importante et plus nette dans les traitements enrichis que dans ceux des contrôles. En effet, alors qu'une augmentation de l'abondance relative des β -Protéobactéries a eu lieu (36,1% dans les traitements enrichis) par rapport aux autres groupes et que cette augmentation semblait se faire au détriment de la classe des α -Protéobactéries qui, présentait une baisse importante de leur abondance par rapport à t_0 (23,3%), aucun changement net n'apparaît dans les traitements contrôles. Cependant, une évolution semblait s'opérer avec notamment, une augmentation d'abondance relative pour les groupes des Actinobactéries et des *Cytophaga-Flavobacterium*.

Si on observe l'évolution de la structure bactérienne non plus du point de vue de l'abondance relative mais d'un point de vue de l'abondance réelle (**Annexe IV**), on vérifie une diminution nette pour les α -Protéobactéries particulièrement dans les traitements enrichis accompagnée d'une augmentation des β -Protéobactéries.

LE

AN

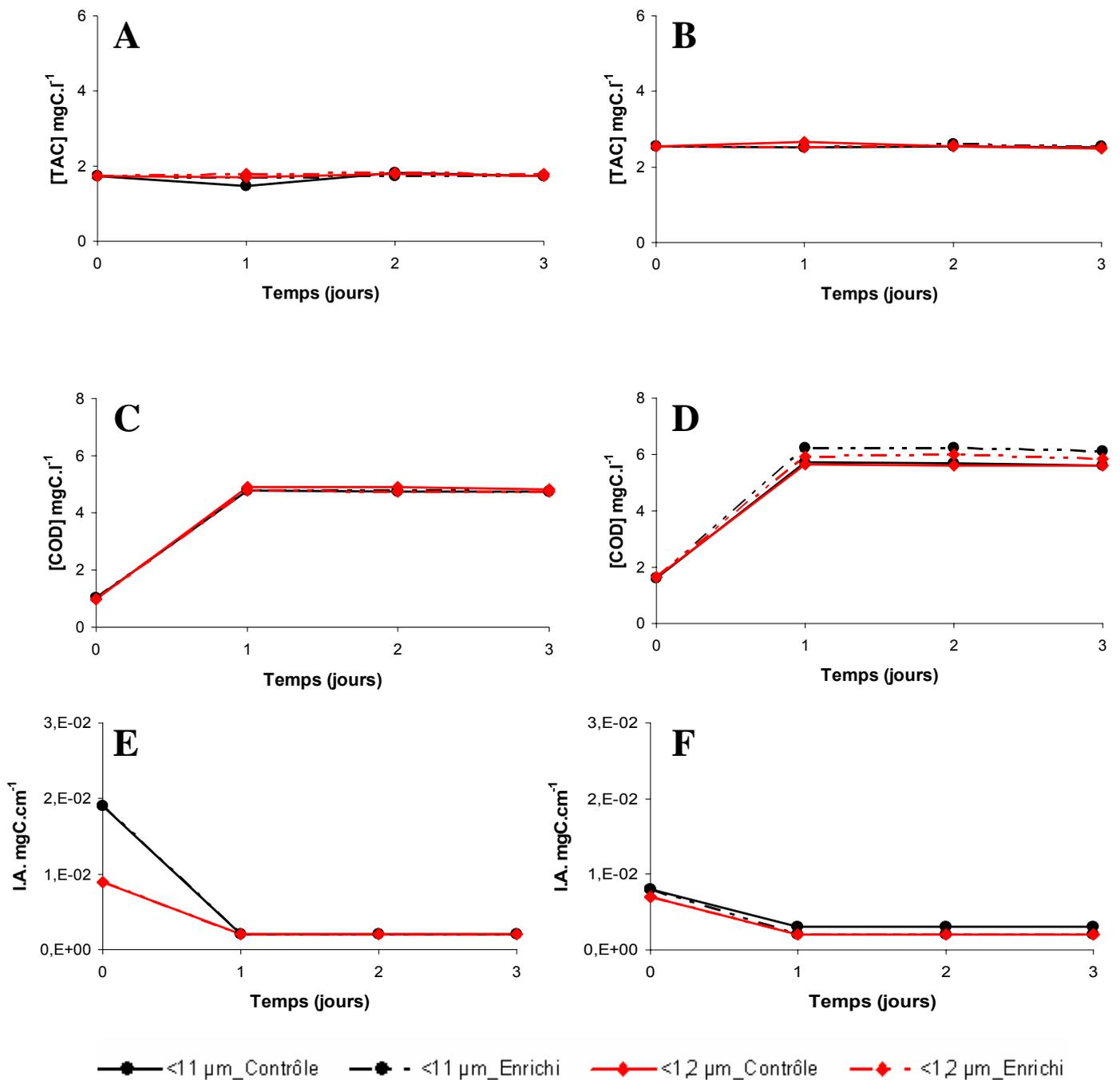


Figure III. 7: Evolution temporelle des différents composés carbonés: Titre Alcalimétrique Complet (TAC, A et B), Carbone Organique Dissous (COD, C et D) et l'indice d'aromaticité (I.A., E et F) dans les traitements contrôles et enrichis de la fraction <11 μm et <1,2 μm au cours des expériences menées au lac Léman (LE) et au lac d'Annecy (AN).

On observe pour la fraction $<1,2 \mu\text{m}$ toujours dans le cas des échantillons du lac Léman, aussi bien pour les traitements contrôles que les traitements enrichis (**Figure III.6**), une augmentation de l'abondance relative des deux groupes bactériens Actinobactéries et *Cytophaga-Flavobacterium* et dans une moindre mesure des β -Protéobactéries. Alors que contrairement à ce qui a été observé dans la fraction $<11 \mu\text{m}$, les α -Protéobactéries présentaient une diminution à la fois de l'abondance relative (27,8% pour les contrôles et 26,6% pour les enrichis) et réelle ($6,37 \cdot 10^4$ et $5,40 \cdot 10^4 \text{ cell.ml}^{-1}$).

L'évolution de la structure bactérienne des échantillons prélevés dans le lac d'Annecy (**Figure III.6**) présentait une évolution sensiblement différente par rapport à celle du lac Léman. L'évolution la plus notable, observée dans la fraction $<11 \mu\text{m}$, concernait le groupe des Actinobactéries qui affichait une baisse notable dans sans abondance relative (13,3%) par rapport à t_0 (23,8%). La classe des β -Protéobactéries tendait vers une augmentation qui semblait être plus marquée dans les traitements contrôles que dans les traitements enrichis.

En ce qui concerne la fraction $<1,2 \mu\text{m}$, il a été observée, quelque soit le traitement considérée (contrôle et/ou enrichi), une augmentation de l'abondance relative de la classe des β -Protéobactéries, et avec une moindre mesure celle des groupes Actinobactéries et *Cytophaga-Flavobacterium*. Ces derniers présentant une augmentation plus importante par rapport à la fraction $<11 \mu\text{m}$.

III.2.3. Evolution des composés chimiques au cours des expérimentations

III.2.3.1. Les composés carbonés

Quelque soit la forme carbonée considérée (COD, TAC et COT) dans le cas du lac Léman (**Figure III.7**), il n'y a pas de différences significatives (test U, $p\text{-value} = 0,762$ pour le TAC et $p\text{-value} = 0,7$ pour le COD, $\alpha = 0,05$) entre les traitements enrichis et contrôles.

L'évolution temporelle du COD se traduit, aussi bien pour la fraction $<11 \mu\text{m}$ que par celle $<1,2 \mu\text{m}$, par une augmentation significative au cours des premières 24 heures d'incubation (**Figure III.7 B**). Au delà de ce temps, les valeurs se stabilisent autour de 5,93 et 5,89 mgC.l^{-1} respectivement. Les concentrations du TAC (**Figure III.7A**) restent relativement stables (1,73 mgC.l^{-1} en moyenne) tout au long de l'expérimentation.

Les mêmes tendances dans l'évolution des composés carbonés sont observées pour les échantillons du lac d'Annecy (**Figure III.7 A**). Au 3^{ème} jour de l'expérience, les concentrations du COD et TAC sont de l'ordre de 7, 5 et 2 mgC.l^{-1} respectivement. Aucune

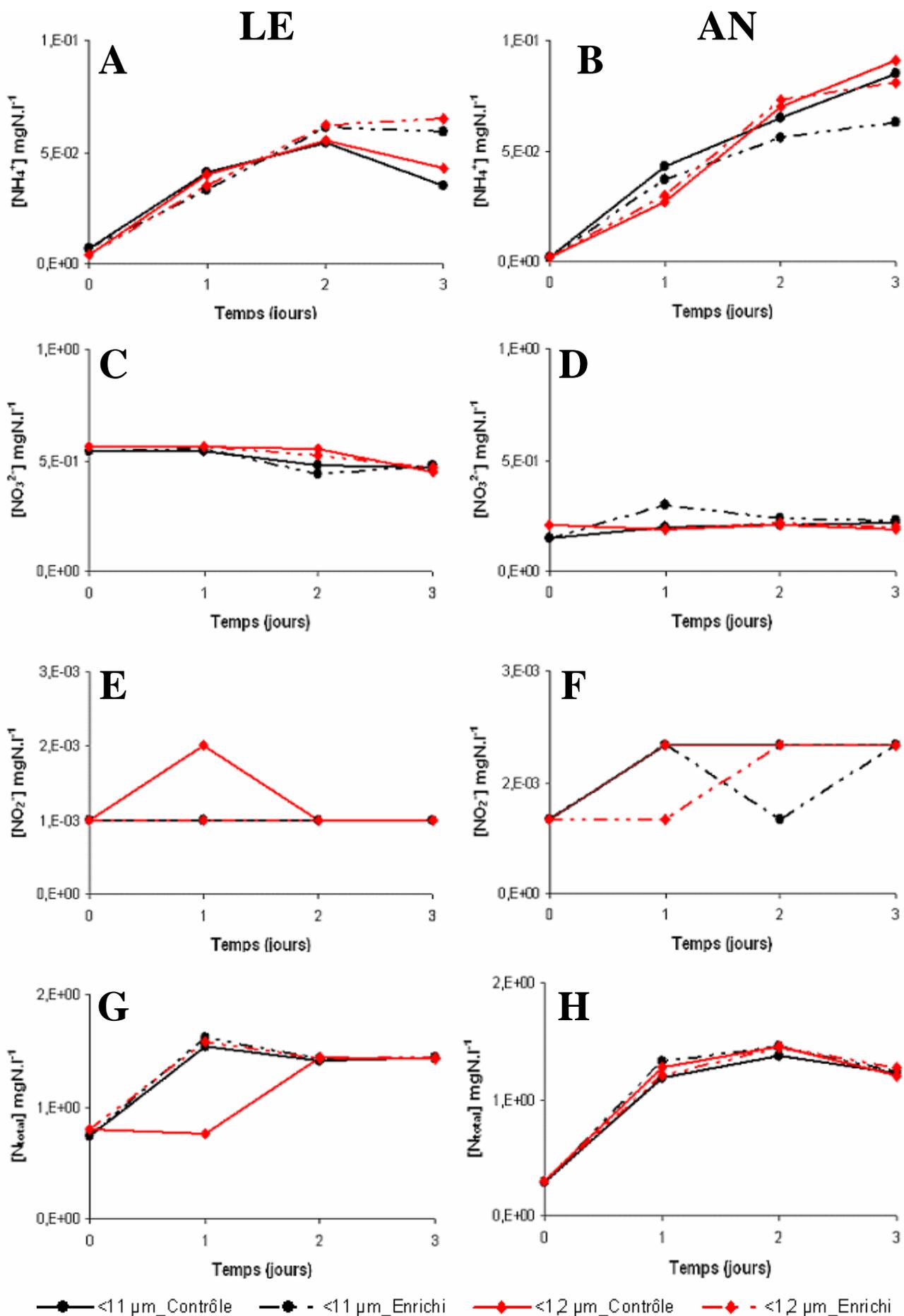


Figure III.8: Evolution temporelle des différents composés azotés : ammonium (NH₄⁺, A et B), nitrates (NO₃²⁻, C et D), nitrites (NO₂⁻, E et F) et l'azote total (N_{total}, G et H) dans les traitements contrôles et enrichis de la fraction <11 µm et <1,2 µm au cours des expériences menées au lac Léman (LE) et au lac d'Annecy (AN).

différence significative (test U, $p\text{-value} = 0,375$, $\alpha = 0,5$) entre les traitements contrôle et enrichi n'est mise en évidence.

III.2.3.2. Les composés azotés

En ce qui concerne l'évolution des formes minérales de l'azote (**Figure III.8**) au cours du temps, pour le lac Léman, la forme ammonium (**Figure III.8 A et B**) est celle qui subit les variations temporelles les plus marquées tandis que les nitrates (**Figure III.8 C et D**) et nitrites (**Figure III.8 E et F**) demeurent relativement stables. Qu'il s'agisse du lac Léman ou du lac d'Annecy, les teneurs en nitrites fluctuent dans une gamme de concentrations très faibles au cours des expérimentations variant entre $0,0015$ à $0,0025 \text{ mgN.l}^{-1}$ (**Figures III.8 E et F**). Les teneurs en ammonium augmentent nettement au cours des deux premiers jours d'expérience, et ceci dans les deux fractions, puis une stabilisation est observée dans les bouteilles enrichies tandis qu'une diminution des teneurs apparaît dans les bouteilles contrôles (**Figure III.8 A et B**).

Une évolution temporelle identique (test U, $p\text{-value} = 0,214$, $\alpha = 0,5$) de l'azote total (**Figure III.8 G**) apparaît dans les traitements contrôles et enrichis de la fraction $<11 \mu\text{m}$, alors qu'une différence sensible de celle-ci est observée pendant deux jours, dans le cas de la fraction $<1,2 \mu\text{m}$. Cependant, quelque soit le traitement et/ou la fraction considéré, à la fin de l'expérience, la concentration de l'azote total est de $1,44 \text{ mgN.l}^{-1}$.

La manipulation effectuée à Annecy permet de mettre en évidence des concentrations en ammonium qui s'accroissent tout au long de l'expérience (**Figure III.8 B**), pour atteindre dans les enceintes contrôles des teneurs s'approchant de $0,1 \text{ mgN.l}^{-1}$ (des valeurs légèrement plus faibles sont mesurées dans les enceintes enrichies en virus).

Avec des différences non significatives entre les traitements (test U, $p\text{-value} = 0,455$, $\alpha = 0,5$), l'azote total présente une évolution identique de sa concentration (**Figure III.8 H**), au cours du temps, pour les deux fractions. Cette évolution décrit une croissance de la concentration de l'azote total dont le maximum ($1,2 \text{ mgN.l}^{-1}$) est atteint au bout de 48 heures d'expérience, les dernières 24h d'expériences sont marquées par une légère décroissance de ces concentrations.

III.2.3. 3. Les composés phosphatés

Dans le cas du lac Léman (**Figure III.9 A**), l'évolution des orthophosphates (PO_4^{3-}) au cours du temps ne présente pas de variation significative (test U, $p\text{-value} < 0,05$, $\alpha = 0,05$) quels que soient les microcosmes considérés. De même, la concentration du phosphate total

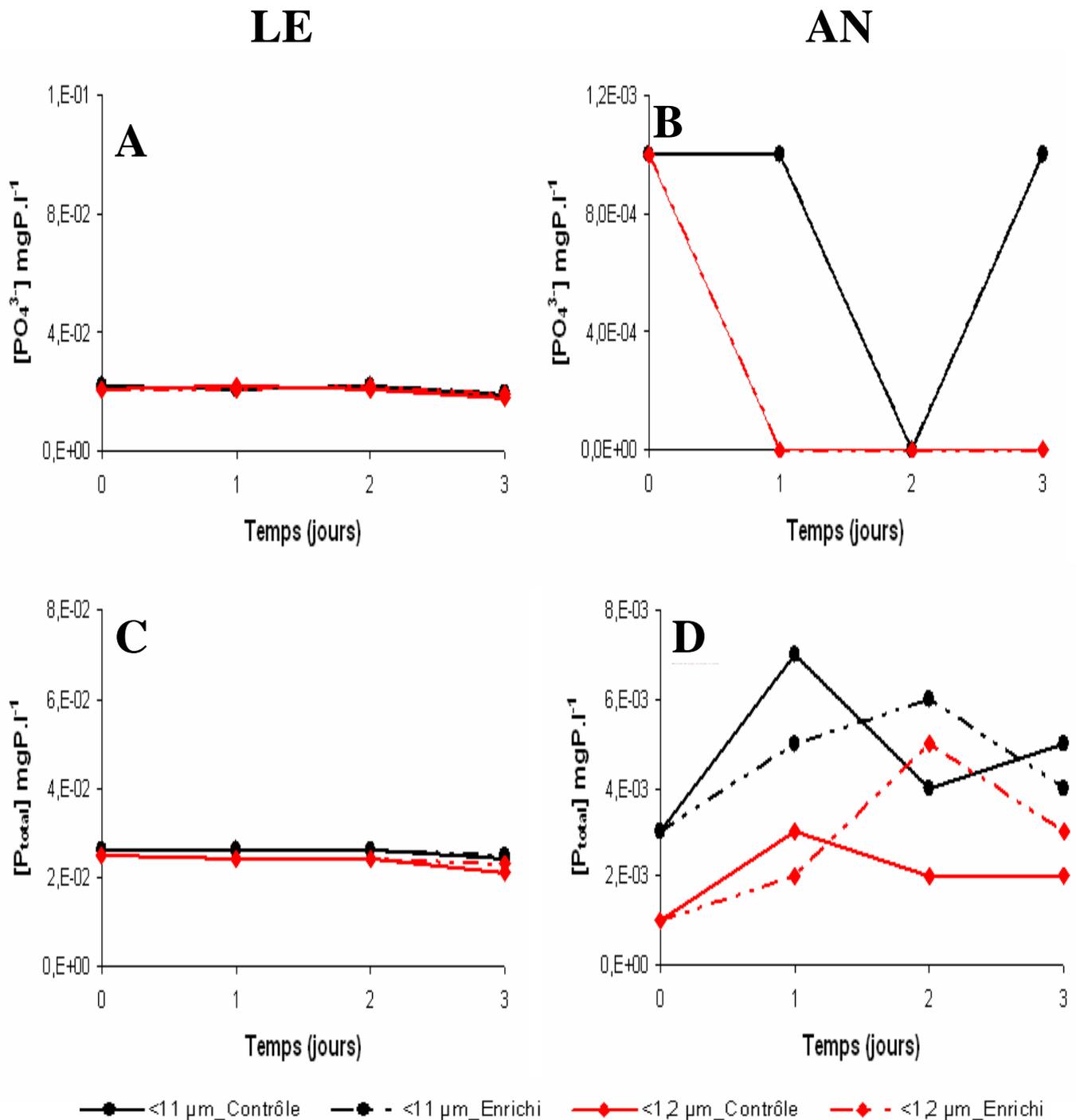


Figure III.9 : Evolution temporelle des différents composés phosphorés : Orthophosphates (PO_4^{3-} , A et B) et le phosphate total (P_{total} , C et D) dans les traitements contrôles et enrichis de la fraction <11 µm et <1,2 µm au cours des expériences menées au lac Léman (LE) et au lac d'Annecy (AN).

reste très stable (**Figure III.9 C**), aussi bien pour la fraction $<11 \mu\text{m}$ ($26 \cdot 10^{-2} \text{ mgP.l}^{-1}$) que pour celle $<1,2 \mu\text{m}$ ($24 \cdot 10^{-2} \text{ mgP.l}^{-1}$), avant de noter une légère baisse au bout du 3^{ième} jour, plus marquée pour les traitements contrôles que pour les traitements enrichis.

A l'inverse, dans l'expérimentation menée à Annecy (**Figure III.9 B et D**), la dynamique des éléments phosphatés est beaucoup plus chaotique. Les teneurs en orthophosphates (PO_4^{3-}) deviennent indétectables dans les traitements contrôles et enrichis (**Figure III.9 B**), au bout de 48 heures d'expérience pour la fraction $<11 \mu\text{m}$ et de 24 heures d'expérience pour la fraction $<1,2 \mu\text{m}$. Tandis que cette situation reste inchangée pour la fraction $<1,2 \mu\text{m}$ ($[\text{PO}_4^{3-}] = 0 \text{ mgP.l}^{-1}$) à la fin de l'expérience, une augmentation des teneurs orthophosphates, avec un retour à une concentration initiale ($10^{-3} \text{ mgP.l}^{-1}$) est observée dans la fraction $<11 \mu\text{m}$. Les résultats significativement différents (test U, p-value = 0,178, $\alpha = 0,05$) obtenus pour les traitements contrôles et enrichis montrent une évolution très contrastée du phosphate total, au cours du temps.

IV.1. Aspect Méthodologique

IV.1.1 Approches expérimentales en microcosmes

L'approche utilisée pour cette étude présente l'avantage, comme toutes les études expérimentales, d'une simplification du système à analyser et du contrôle des paramètres choisis, permettant de mettre clairement en évidence l'action des facteurs de régulation potentiels sur le système étudié. Si le principe de l'incubation *in situ* a permis par ailleurs de conserver des conditions de température et d'éclairement assez proches de celles du milieu naturel, il est bien évident que les faibles volumes utilisés ont pu entraîner un confinement et un développement spécifique de certaines communautés. Aussi, pour limiter cet effet, nous sommes-nous attachés à utiliser des volumes adaptés aux différentes communautés étudiées avec des temps d'incubation courts mais toutefois suffisants pour obtenir des réponses des communautés procaryotiques aux différents traitements (*Duhamel et al., 2006*).

La transposition des résultats expérimentaux obtenus en microcosmes à des situations naturelles est toujours délicate, et il paraît évident qu'une approche écosystémique aurait permis de confronter les résultats et ainsi de corroborer les observations faites lors de ces expérimentations. Cependant, il faut rappeler que l'approche terrain présente comme principal inconvénient de prendre en considération l'ensemble des composants de l'écosystème, ce qui augmente la complexité et limite la possibilité d'une analyse fine des résultats (*Srivastava et al., 2004*). Le couplage des deux approches semble donc particulièrement pertinent à la compréhension des mécanismes structurant les réseaux trophiques microbiens. Ce genre de couplage entre approche écosystémique et approche expérimentale est opéré pour l'étude des réseaux trophiques des lacs alpins. Dans le cas de cette étude, nous ne considérerons toutefois que les résultats expérimentaux qui doivent nous permettre d'identifier des interactions spécifiques et de décortiquer au moins en partie le fonctionnement du réseau microbien à la période de réalisation des manipulations (hiver).

IV.1.2 Représentativité des communautés prélevées

Compte tenu du fait que les échantillons d'eau permettant de constituer les différents types de traitements expérimentaux ont été prélevés de manière intégrée dans la strate 0-8 m en un seul point du lac, la question de la représentativité de ce seul échantillon initial pouvait se poser, en particulier pour l'analyse de la structure de la communauté bactérienne d'écosystèmes lacustres de grande taille. *Yannarell et Triplett (2003)* et *Dorigo (2005)* ont, en

parti, répondu à cette question. En travaillant sur 13 lacs de Wisconsin et sur le lac du Bourget (France) respectivement, ces auteurs ont révélé qu'en hiver, l'abondance de la communauté bactérienne et la structure de celle-ci étaient très homogènes sur une échelle horizontale, en concordance avec les caractéristiques hydrodynamiques de ces lacs. Les conclusions de ces travaux démontraient qu'un nombre restreint d'échantillons dans l'espace horizontal est suffisant pour estimer de façon fiable et représentative la structure de la communauté bactérienne de la zone pélagique, à condition d'être loin de l'influence notable des embouchures des affluents des systèmes étudiés. Ainsi, nous estimons que les deux points de prélèvements considérés au cours de cette étude, étaient suffisamment pertinents pour décrire de façon représentative l'abondance et la composition de la communauté bactérienne à l'échelle horizontale du lac Léman et du lac d'Annecy, et que les processus et interactions identifiés dans le cadre de ces expérimentations étaient globalement extrapolables à l'ensemble de la zone épilimnique pélagique.

VI.1.3 Analyse de la structure de la communauté bactérienne par la méthode FISH

L'étude de la structure de la communauté bactérienne a été réalisée au moyen d'une technique de biologie moléculaire appelée FISH. Cette méthode a déjà été largement utilisée dans l'étude de la dynamique des groupes phylogénétiques des procaryotes planctoniques. C'est le nombre élevé de ribosomes dans une cellule bactérienne qui permet d'obtenir une amplification naturelle du signal visible lors de l'hybridation des sondes oligonucléotidiques choisies et révélées au moyen d'un fluorochrome. Dès lors, il est reconnu que cette technique présente une faible capacité à marquer les cellules présentant un faible nombre de ribosomes ou une faible activité métabolique ou une faible perméabilité cellulaire (*Bouvier et Del Giorgio, 2002*). Ceci expliquerait en partie le fait que le pourcentage de cellules marquées par la méthode FISH en comparaison des bactéries totales dénombrées au DAPI n'atteint que rarement les 100% (même dans le cas de l'utilisation de sondes généralistes ciblant à priori toutes les Eubactéries et Archae). Par ailleurs, les variations observées dans l'abondance relative des différents groupes étudiés par rapport à l'abondance totale des bactéries marquées au DAPI, peuvent également être reliées au fait que les sondes utilisées ne couvrent pas entièrement le groupe ciblé ou manquent de spécificité (*Amann et al., 1995 ; Daims et al., 1999; Weller et al., 2000*). Cela a déjà été constaté par exemple avec la sonde CF319a (*Weller et al., 2000*).

En ayant à l'esprit ces limitations, notre analyse de la structure de la communauté bactérienne avait donc pour but de visualiser des modifications dans l'abondance et l'importance relative des groupes les plus caractéristiques des Eubactéries, suite à la manipulation des prédateurs bactérivores et/ou des virus. Les groupes bactériens que nous avons choisi de suivre ont été sélectionnés sur la base d'analyses précédemment effectuées dans les lacs concernés, analyses qui ont permis de mettre en évidence la présence récurrente et quantitativement importante de ces groupes bactériens.

IV.2 Facteurs régulant les abondances de la communauté bactérienne

L'étude de la communauté bactérienne à partir de l'analyse cytométrique a révélé une assez grande stabilité de l'abondance au cours du temps et, des concentrations étaient relativement faibles par rapport à celles enregistrées par *Dorigo (2005)* à la même période.

L'abondance bactérienne est un très bon indicateur de la dynamique bactérienne, cependant, elle ne rend pas compte de l'activité réelle de la communauté bactérienne. Des mesures de production bactérienne auraient permis de mieux apprécier l'état physiologique de celle-ci et ainsi de mieux comprendre les facteurs clés impactant sur son évolution. Ceci est d'autant plus vrai que certains travaux (*Jardillier et al., 2005 ; Boucher et al., 2005*) ont rapporté l'absence de relation significative entre abondance et production bactériennes. La qualité de la matière organique présente dans les microcosmes était fortement labile d'après les faibles valeurs que nous avons mesurées pour l'indice d'aromaticité (I.A.); il est donc peu probable que la croissance bactérienne ait été limitée par la qualité de cette matière organique. Ainsi, l'hypothèse la plus probante est que la croissance des bactéries était fortement limitée par les très faibles températures enregistrées au cours de l'incubation (<6°C). En travaillant sur le réservoir du Sep (Massif Central, France), *Boucher et al. (2005)* ont clairement montré que la vitesse de dégradation de la matière organique par la communauté bactérienne dépendait fortement de la température et qu'elle tendait à ralentir avec la baisse des températures.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un impact régulateur significatif de la prédation par les flagellés hétérotrophes, sur la base de l'évolution quasi-similaire de l'abondance bactérienne observée dans les deux fractions <11 µm et <1,2 µm. Les raisons qui peuvent expliquer cela sont nombreuses.

Rappelons tout d'abord que l'impact de la prédation sur la communauté bactérienne dépend d'une relation concomitante entre l'abondance bactérienne et le mode de nutrition des

flagellés hétérotrophes. En effet, on sait que les protistes flagellés capturent leur proie par interception directe et que ce processus est donc dépendant de la densité. Les abondances bactériennes observées au cours de cette période hivernale, étaient faibles par rapport à ce qui a été précédemment enregistré (*Dorigo, 2005*). On peut, donc, envisager que le faible impact observé soit en partie dû à une faible probabilité de rencontre entre les prédateurs et leurs proies.

Il est également possible de penser que, ce n'est pas l'effet de la prédation sur les bactéries qui ait été décrit par nos résultats mais plutôt une régulation ou un contrôle de cette interaction par un facteur autre que ceux étudiés au cours de cette étude. Là encore, la température pourrait constituer ce facteur. En effet, il apparaît clairement que les faibles valeurs de température ont fortement limité les capacités physiologiques des bactéries et, ceci aurait pu être déterminant dans le choix des proies par les flagellés hétérotrophes qui font subir une action de prédation au moins quatre fois plus importante sur les bactéries actives que sur les bactéries inactives (*Del Giorgio et al., 1996*). Encore une fois, cette faible activité bactérienne était clairement suggérée par l'absence de croissance bactérienne dans les enceintes expérimentales ne contenant ni prédateurs ni d'ajout en particules virales.

Une réponse typique des bactéries à la pression de prédation consiste souvent en une évolution morphologique des cellules vers des formes filamenteuses (*Jürgens et al., 1999*). Ce genre d'effet structurant n'a pas été observé au cours de cette étude, la proportion des bactéries filamenteuses n'évoluant pas et restant faible.

Il est important de rappeler, par ailleurs, que même si les principaux prédateurs et régulateurs de la communauté bactérienne sont classiquement les flagellés hétérotrophes, d'autres organismes peuvent intervenir de manière significative dans la régulation de l'abondance bactérienne en milieu lacustre. Les ciliés et les métazoaires, notamment les cladocères du genre *Daphnia* sont également des consommateurs de bactéries (*Kisand et Zingel, 2000*). Il est envisageable, que notre étude se soit située à une période pendant laquelle les prédateurs principaux ne sont pas les flagellés présents dans la fraction $<11 \mu\text{m}$. En effet, Une étude récente réalisée sur un lac périalpin mésotrophe, le lac du Bourget présentant de grandes similitudes de fonctionnement avec le lac Léman, a démontré les grandes variations saisonnières qu'il peut y avoir dans l'importance relative des divers types de prédateurs (*comte et al., sous presse*)

Notons enfin, la possibilité d'une auto-régulation de l'abondance des principaux bactérivores à l'intérieur de la fraction $<11 \mu\text{m}$. En effet le choix d'une fraction de taille $<5 \mu\text{m}$ pour la réalisation des expérimentations, permettant d'isoler les plus petits des flagellés

souvent considérés comme ayant le plus fort impact en terme de bactériovorie aurait peut être fournit des résultats différents. Il est tout à fait envisageable, qu'au sein de la fraction <11 µm, des phénomènes de prédation se soit exercées de manière significative sur les flagellés les plus petits (*Samuelson et Domaizo, non publié*).

Bien que l'enrichissement ait permit d'obtenir significativement plus de virus dans les bouteilles enrichies que dans les bouteilles témoins, cette augmentation de la charge virale n'a pas entraîné de variations significatives dans les abondances bactériennes. Par comparaison, les études *Steward et al. (1996)* et *Yager et al.(2001)*, ont mis en évidence une chute significative de l'abondance bactérienne dans les bouteilles enrichies en virus alors que, celle de *Jardillier et al. (2005)*, à l'inverse, a permis d'observer une tendance à l'augmentation.

Ces résultats divergents laisseraient penser que, comme pour la prédation, plusieurs facteurs sont susceptibles d'expliquer les variations de l'abondance bactérienne par rapport à la lyse virale. Parmi ceux ci, on peut rappeler que près de 50% de la communauté virale peut ne pas être infectieuse (*Wilhelm et al., 1998*) et la majorité des bactéries peuvent résister à l'infection virale (*Winter et al., 2004*) par réduction du nombre de récepteurs viraux à la surface de la cellule. Les expériences d'enrichissement en virus de *Weinbauer et Holf (1998)* et *Simek et al. (2001)* ont montré que les morphotypes bactériens ne semblent pas présenter la même fréquence d'infection suivant qu'il s'agit de bactéries en bâtonnet ou de formes filamenteuses, ces dernières ne présentant aucune infection. Enfin, on peut envisager que dans les bouteilles enrichies, les bactéries pourraient être responsables d'une production d'enzymes importante qui dégradent les protéines et les acides nucléiques viraux. Toute fois les deux dernières hypothèses sont peu probables en regard de ce que nous avons dis plus haut.

Le protocole expérimental de préparation du concentrât viral, basé sur une série de filtration et d'ultrafiltration et de centrifugation pourrait avoir un effet non négligeable sur l'efficacité virale. En effet, certaines études ont montré qu'une inactivation des virus plus importante est observée après les processus de filtration et de centrifugation (*Kapuscinski et Mitchell, 1980; Moebus, 1992*).

Au regard de nos résultats, il semble que ce soit la température qui puisse être un facteur de contrôle de l'activité virale. D'après *Bratback et al. (1994)*, la vitesse de multiplication des virus est plus rapide à 20°C qu'à 5°C, cette dernier valeur correspondant à celle enregistrée au cours de l'incubation. De plus, il est reconnu que la faible activité métabolique des bactéries en rapport avec la température ne se traduit pas par une activité lytique importante

Enfin, un des facteurs limitant l'effet viral dans le cas particulier de nos expérimentations pourrait être un enrichissement viral insuffisant. Même si des études ont pu mettre en évidence un impact de la lyse virale sur l'abondance bactérienne avec des facteurs d'enrichissement variant de 2 à 5, on peut envisager que dans les conditions environnementales caractéristiques de nos expérimentations ce facteur ait donc été insuffisant pour entraîner une action virale significative.

IV.3 Facteurs régulant la structure de la communauté bactérienne

La somme de l'abondance des quatre groupes obtenue à partir de l'analyse FISH était toujours inférieure à l'abondance bactérienne totale dénombrée par marquage au DAPI. Ceci pourrait être dû au fait que certains groupes comme les Archaea reconnu comme étant une composante ubiquiste et métaboliquement active en milieu d'eau douce (*Massana et al., 2000; Karner et al., 2001*), et/ou certaines divisions telles que les γ -Protéobactéries ou les Verrucomicrobiaceae, n'ont pas été pris en compte dans nos dénombrements, alors qu'elles peuvent constituer une proportion significative du bactérioplancton dans les écosystèmes lacustres (*Glöckner et al., 2000*).

L'analyse structurelle de la communauté bactérienne, au début de l'expérience, a révélé à partir de la méthode FISH une différence sensible entre les échantillons des deux lacs, notamment dans la dominance des groupes. Ainsi, il a été remarqué que les deux groupes taxinomiques dominants pour le lac Léman et d'Annecy sont respectivement la sous-classe des α -Protéobactéries (59% du total des quatre sondes) et le groupe des *Cytophaga-Flavobacterium* (40% du total des quatre sondes).

Nos résultats ne sont pas tout à fait en accord avec ceux de *Dorigo (2005)*. En effet ces auteurs ont montré, à partir de l'étude de la dynamique structurelle bactérienne des trois grands lacs Alpains (Bourget, Léman et Annecy), en surface comme à 50 m de profondeur, en hiver comme au printemps et en été, que le groupe taxinomiquement dominant correspondait à celui des Actinobactéries (51% de toutes les séquences d'Eubactéries). Ce groupe était suivi des deux sous-classes des Protéobactéries, α et β , avec respectivement 16% et 16% de la totalité des séquences d'Eubactéries identifiées. Les *Cytophaga-Flavobacterium* constituaient le groupe le plus faiblement représenté dans ces lacs (5%). Ces différences de résultats pourrait être expliquées par la phase de préfiltration sur 2 μm qu'ont subit les échantillons d'eau dans l'étude de *Dorigo (2005)*. Cette préfiltration aurait pu retenir une part importante des *Cytophaga-Flavobacterium* en raison de leur taille moyenne plus élevée, ce qui

correspondrait parfaitement au cas du Léman où on observe une perte importante du marquage FISH pour la fraction <1,2 µm comparativement à la fraction <11 µm. Par ailleurs, les deux méthodes d'analyses de la communauté bactérienne sont très différentes puisqu'il s'agissait de clonage/séquençage pour l'analyse faite par *Dorigo (2005)* et de la méthode FISH dans le cas de cette étude, la comparaison est de ce fait délicate. Il est envisageable que des biais méthodologiques induisent une sous estimation de l'abondance des *Cytophaga-Flavobacterium* par la méthode du séquençage et/ou une surestimation par la méthode FISH en raison de marquage non spécifique par exemple. Il faut noter, par ailleurs, que ce type d'écart de résultats entre l'analyse de clonage séquençage et la méthode FISH a précédemment été rapporté dans le cas du lac du Bourget au cours de l'étude réalisée par *Comte et al. (2005)* qui rapportait également une abondance assez élevée des *Cytophaga-Flavobacterium* en 2002.

Les études effectuées par la méthode FISH ont révélés, de manière générale que, les *Cytophaga-Flavobacterium* ainsi que les α -Protéobactéries étaient très abondants et souvent numériquement dominants dans les écosystème marins et d'eau douce (*Glöckner et al., 2000; Giovannoni et Rappé, 2000*). Il semblerait que ces groupes soient favorisés en présence de certains types de nutriments, ainsi, les α -Protéobactéries auraient tendance à se développer, suivant *Schweitzer et al. (2001)* en présence d'une importante quantité d'agrégats sur lesquels ils se développeraient alors que, les *Cytophaga-Flavobacterium* supplanteraient les autres groupes par leur capacité à dégrader des polymères et des macromolécules organiques dissoutes (*Zwisler et al., 2003*).

Lindström et al. (2005) ont montré, en comparant des données obtenues dans 50 lacs, que la structure bactérienne dépendait fortement du pH et de la température. En raison de leur origine glaciaire, de leur localisation et de leurs caractéristiques géologiques, ces deux lacs présentent les mêmes paramètres physiques de température et de pH (*Dorigo, 2005*). Les différences majeurs concernent plutôt leur état trophique (lac Léman : mésotrophe; lac d'Annecy : oligotrophe). Il est donc, fort probable que la quantité et la qualité de la matière organique ainsi que les teneurs en nutriments soient à l'origine de cette disparité, comme cela a déjà été observé dans d'autres écosystèmes (*Lindströmet al., 2005; Yannarell et Triplett, 2004*).

Après 72 heures d'incubation, des changements dans l'abondance relative des différents groupes bactériens ont été observés. Ces changements se caractérisaient par une baisse des groupes dominants à t0 (α -Protéobactéries et *Cytophaga-Flavobacterium* respectivement pour

le lac Léman et le lac d'Annecy) et, en contre partie, par une augmentation plus ou moins globale des autres groupes. Toutefois, l'abondance totale de la communauté bactérienne restait stable bien que ces modifications de structure s'opéraient au cours du temps, avec non plus une dominance claire d'un groupe par rapport aux autres, comme cela avait été observé à t₀, mais un relatif équilibre dans la proportion relative des 4 groupes bactériens considérés.

Une étude similaire récente effectuée au lac Pavin (Massif Central, France) dans le cadre de l'évaluation de l'impact des virus et de la prédation sur la communauté des bactéries hétérotrophes a permis d'observer également une augmentation des abondances relatives des différents groupes bactériens marqués (*Jardillier et al., 2005*). Toutefois, le groupe des β -Protéobactéries qui dominait à plus de 44% du total des cellules hybridées à t₀, semblait maintenir cette dominance à t₃ (59% du total des cellules hybridées) (*Jardillier et al., 2005*).

Conformément aux résultats récents de *Jardillier et al. (2005)* obtenus en milieu lacustre, notre travail montre que l'augmentation de l'abondance virale est susceptible de modifier la structure de la communauté bactérienne. Les différents résultats obtenus en comparant les traitements contrôles et enrichis du lac Léman ont montré que cette action virale tend à faire augmenter l'abondance de la classe des β -Protéobactéries et faire diminuer celle de la classe de α -Protéobactéries. L'effet de cette action était moins net pour le lac d'Annecy. En conséquence, on pourrait supposer que la lyse virale a un effet significativement plus important en milieu eutrophe (lac Léman) qu'en milieu oligotrophe (Lac d'Annecy), comme cela a été constaté dans le modèle de *Roué et al. (2001)* et dans les résultats de *Jardillier et al. (2005)*.

En raison de la relation spécifique hôte-virus, la relation entre la lyse virale et la diversité microbienne peut, *a priori*, s'expliquer plus facilement que celle qui lie la structure de la communauté bactérienne à l'activité bactériovore. L'impact des virus sur la structure de la communauté bactérienne peut se faire selon la théorie du « killing de winner » qui suggère un contrôle de la population hôte remportant la compétition pour les ressources (*Fuhrman et Suttle, 1993; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004*).

L'effet de la prédation sur la structure bactérienne était faible, on observait seulement pour le lac Léman une augmentation de l'abondance de la sous-classe des β -Protéobactéries en absence de prédateurs. Toute fois, Il est très important de prendre avec précaution les résultats observés au vu de la grande disparité qui pouvait apparaître entre deux duplicats. Bien que nous disposions de triplicats, il ne nous a pas été possible, faute de temps, de réaliser le marquage sur l'ensemble des trois répliquats, qui auraient permis d'acquérir des données

statistiquement plus fiables. L'analyse du troisième réplicat pourra toutefois être effectuée à posteriori afin de confirmer les observations présentées dans ce rapport.

Enfin, on a pu remarquer au cours de cette étude, une différence nette dans l'évolution de l'abondance des différents groupes, entre les traitements contrôles et enrichis, en particulier dans les fractions $<11 \mu\text{m}$, donc en présence de prédateurs, aussi bien pour le lac Léman que celui du lac d'Annecy. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas du groupe des Actinobactéries. En effet, les résultats ont montré que dans la fraction $<1,2 \mu\text{m}$ (absence de prédateur), une baisse importante de l'abondance de ce groupe dans les traitements enrichis apparaît (par rapport aux contrôles où il reste relativement stable), alors que dans la fraction $<11 \mu\text{m}$ (présence de prédateur), ce contraste entre les deux types de traitements n'était plus visible. Cette observation laisse supposer que l'activité de prédation aurait un effet sur l'efficacité de la lyse virale s'exerçant sur le groupe des Actinobactéries. Des effets de synergie pourrait exister entre prédation et lyse, ce qui a été démontré dans quelques études (*Šimek et al., 2001; Weinbauer et al., 2003; Jacquet et al., en révision*).

Les expérimentations *in situ* effectuées au cours de cette étude ont permis de mettre en évidence des modifications de la structure de la communauté bactérienne alors que l'abondance de celle-ci n'a présenté que peu de variation. La modification de la structure bactérienne s'est manifestée par une baisse de l'abondance relative des groupes dominants au début de l'expérience, et une augmentation d'autres groupes variables selon le lac considéré et le type de traitement. A l'issue de cette étude, nous n'avons pas pu répondre à toutes les questions posées initialement, particulièrement, les réponses biologiques suite à la manipulation des prédateurs et des virus ont généralement été de faible amplitude. Notre étude comparative s'est limitée à un nombre très faible d'échantillons et, la difficulté à obtenir des réponses nettes aux manipulations a probablement été en grande partie liée à la période d'étude durant laquelle les communautés étaient présentes à de faibles abondances et surtout, étaient caractérisées par un état de faible activité notamment expliqué par les très faibles températures. Même s'il est reconnu que les principaux facteurs de régulation d'une communauté bactérienne sont la prédation et la lyse virale ainsi que les ressources en matière organique, les résultats obtenus au cours de cette étude laissent penser que la température était un facteur physique clé qui dynamise ou limite l'ensemble du réseau trophique microbien au travers des interactions ayant lieu au sein de la boucle microbienne.

A court terme, les perspectives d'étude qui ressortent de notre analyse sont:

- 1) Reconduire cette expérience en période estivale, afin de cibler une période d'activité biologique plus élevée pour les différentes communautés microbiennes (période prévue : juillet-août 2006) et où les ressources nutritives sont fortement limités dans les eaux de surface
- 2) Prendre en considération des paramètres qui rendent compte de l'activité et de l'état physiologique réel de la communauté bactérienne, comme par exemple la production bactérienne par la méthode d'incorporation de la Thymidine radiomarquée, ou l'utilisation de fluorochrome rendant compte de l'activité des cellules.

A plus long terme, les perspectives d'étude qui permettrait d'affiner notre réflexion par rapport à cette problématique, pourraient être résumées comme suite :

- 1) Un suivi annuel des effets de la prédation et de la lyse virale sur les communautés bactérienne, en travaillant sur ces deux lacs aux caractéristiques trophiques différentes, en

effectuant un prélèvement une fois par mois et cela à trois profondeurs caractéristiques des différentes strates de la colonne d'eau (épi, méta et hypolimnium), afin d'avoir une idée sur la dynamique de ces interactions à plus grande échelle spatio-temporelle..

2) Au cours de cette étude nous avons fait le choix d'utiliser la méthode TSA-FISH, qui nous a permis de dénombrer différents groupes bactériens et d'avoir donc une dynamique de ces groupes. En revanche, des limites et certains biais peuvent être associés au fait que cette technique présente une faible capacité à marquer les cellules caractérisées par une faible activité métabolique et une faible perméabilité cellulaire. Il serait donc intéressant voir nécessaire d'utiliser d'autres techniques moléculaires pour affiner nos résultats, particulièrement celles qui associent l'analyse de la diversité taxonomique à l'analyse fonctionnelle. Ainsi, elles permettront de mieux connaître le rôle joué pour chaque groupe taxonomique et la signification fonctionnelle de la diversité des communautés bactériennes aquatiques. Parmi ces méthodes, on pourrait envisager l'utilisation de la méthode dite « FISH-Micoautoradiographie », développée par Lee et al. (1999) dont le principe est d'associer l'assimilation d'un produit radioactif à un micro-organisme qui est lui-même détecté par Hybridation *in situ*.

- Amann, R.I., 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol. Microb. Ecol. Manual*, 3.3.6, 1-15.
- Amblard, C., Boisson, J.C., Boudier, G., Fontvieille, D., Gayte, X., 1998. Ecologie microbienne en milieu aquatique : des virus aux protozoaires. *Revue des sciences de l'Eau*, 145-162.
- Azam, F.T., Fenchel, J.G., Field, J.S., Grau, L.A., Meyer, R., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology-Progress Series*, 10, 257-263.
- Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., M., Haldal, 1989. High abundances of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340, 467-468.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Dolam, J., 2004. Viral Activity in Two Contrasting Lakes Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2941-2951.
- Binder, B.J., Chisholm, S. W., Olson, R.J., Fronkel, S.L., A.Z., Worden, 1996. Dynamics of picophytoplankton, ultraphytoplankton and bacteria in the central equatorial Pacific. *Deep Sea Res.*, 43, 907-931.
- Binder, B.J., Chisholm, S.W., Olson, R.J., Frankel, S.L., A.Z., Worden, 1996. Dynamics of picophytoplankton, ultraphytoplankton and bacteria in the central equatorial Pacific. *Deep. Sea Res.*, 43, 907-937.
- Boucher, D., Sime-Ngando, T., Debroas, D. et Romagous, J.C., 2005. Phage bacteriolysis, protistan bacteriovory potential and bacterial production in a freshwater reservoir : coupling with temperature. *Microb. Ecol.*, 50, 64-72.
- Campbell, L., Nolla, H. A., D., Vautot, 1994a. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 39, 954-961.
- Carrias, J.F., Amblard, C., Bourdier, G., 1996. Protistan bacteriovory in oligomesotrophic lake : importance of attached ciliates and flagellates. *Microb. Ecol.*, 31, 249-268.
- Collier, J.L., 2000. Flow cytometry and the single cell in phycology. *J. Phycol.*, 36, 628-644.
- Courties, C., Vaquer, A., Trousselier, M., Lautier, J., Christiennot-Dinet, M.J., Neveux, J., Machado, C., Clauster, 1994. Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370, 255.
- Daims, H, Bruehl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 434-444.
- Del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., Vaqué, D., Mura, P., Agusti, S., Duarte, C.M., 1996. Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnol Oceanogr*, 41: 1169-1179.
- Delongi, E.F., Wu, K.Y., Prézelin, B.B., R.V.M., Jovine, 1994. High abundance of archae in Antarctic marine picoplankton. *Nature*, 371, 605-697.
- Duhamel, S., Domaizon-Pialat, I., Personnic, S., Jacquet, S., 2006. Assessing the microbial community dynamics and the role of bacteriophages in bacterial mortality in lake Geneva. *Revue des sciences de l'eau*, 19(2), 115-126.
- Eikrem, W., Throndsen, J., 1990. The ultrastructure of *Bathycoccus* gen.nov and *B. prasinos* sp. nat., a non motile picoplanktonic alga (Chlorophyta, Prasinophyceae) from the Mediterranean an Atlantic. *J. Phycol.*, 29, 344-350.
- Fuchs, B.M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwige, W., R., Amann, 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16SrRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microb.*, 64, 4973-4982.
- Fuhrman, J.A., 1992. Bacterioplankton roles in cycling of organic matter. The microbial food web. In: Primay productivity and biochemical cycles in the sea. Falkowski (P.G.), Woodhead (A.D.), eds., Plenum Press, New York, 361-383.
- Fuhrman, J.A., 2001. Plankton viruses. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing group. London.
- Fuhrman, J.A., R.T., Noble, 1995. Viruses and protests cause similat bacterial mortality in coastal seawater. *Limnal. Oceanogr.*, 40(7), 1236-1242.
- Furhman, J.A., McCallum, K., A.A. Davis, 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific. *Oceans. Appl. Environ. Microb.*, 59, 1294-1302.

- Furhman, J.A., Sleeter, T.D., Carkson, C.A., L.M., Proctor, 1989. Dominance of bacterial biomasse in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 57, 207-217.
- Gasol, J.M., Del Giorgio, P.A., Duarte, C.M., 1997. Biomasse distribution in marine planktonic communities. *Limnology Oceanography*, 42, 1353-1363.
- Giovanni, S. et Rappé, M., 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In *Microbial Ecology of the oceans*. Kirchman, B (ed), New York, Wiley-Liss, 47-84.
- Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Amann, R., 2000. Comparative 16S rRNA analyse of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5053-5065.
- Gobler, C.J., Hutchins, D.A., Ficher, N.S., Cosper, E.M., S.A., Sañudo-Wilhelmy, 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se, and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnol. Oceanogr.*, 42(7), 1492-1504.
- Golden, S.S., Ishiura, M., Johnson, C.H., T., Kondo, 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 48, 327-354.
- Golden, S.S., Ishivra, Johnson, C., Johnson, H., T. Kondo, 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 48, 327-354.
- Guillou, L., Moon-Van Der Staay, S., Claustr, H., Partensky, F., D., Vaultot, 199b. Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterkonta) in two oceanic regions. *Appl. Environ. Microb.*, 65, 4528-4536.
- Jacquet, S., Domaizon, I., Personnic, S., Duhamel, S., Pradeep Ram, A.S., Heldal, M., Sime-Ngando, T., 2005. Estimates of viral-induced vs. protozoan-induced bacterial mortality in lake Bourget, France. *Freschw. Biol.*, 50, 627-645.
- Jacquet, S., Heldal, M., Iglesias-Rodriguez, D., Larsen, A., Wilson, W., Bratbak, G., 2002. Flow cytometric analysis of an Emiliana huxleyi bloom terminated by viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.*, 27, 111-124.
- Jardillier, L., Bettarel, Y., Richardot, C., Amblard, C., Sime-Ngando, T., 2005. Effetcs of viruses and predators on prokaryotic community composition. *Microb. Ecol.*, 50, 557-569.
- Joux, F., Jeffrey, W.H., Lebaron, P., D.L., Mitchell, 1999. Marine bacterial isolates display responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microb*, 65, 3820, 3827.
- Joux, F., P. Lebaron, 1995. Applications en écologie bactérienne des sondes oligonucléotidiques fluorescents par les techniques d'hybridation et de cytométrie. *Oceanis*, 21, 125-138.
- Jumars, P.A., Penry, D.L., Baross, J.A., Perry, M.J., Frost, B.W., 1989. Closing the microbial loop: dissolved carbon pathway to heterotrophic bacteria from incomplete ingestion, digestion and absorption in animals. *Deep-Sea Research*, 36, 483-495.
- Jürgens, K., 1994. Impact of Daphnia on planktonic microbial food webs-A review. *Marine Microbiology food webs*, 8, 295-324.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., Amann, R., 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in reponse to enhanced protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1241-1250.
- Kisand, V., Zingel, P., 2000. Dominance of ciliate grazing on bacteria during spring in a shallow eutrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 22, 135-142.
- Li, W.K.W., 1998. Annual average abundance of heterotrophic bacteria and Synechococcus in surface Ocean waters. *Limnol. Oceanogr.*, 43, 1746-1753.
- Marie, D., Brussard, C.P.D., Thyraug, R., Bratbak, G., D., Vaultot, 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 45-52.
- Marie, D., Vaultot, D., F., Partensky, 1996. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1649-1655.
- Marie, D., Vaultot, D., Partensky, F., 1996. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1649-1655.
- Matz, C, Jürgens, K., 2003. Interaction of nutrient limitation and protozoan grazing determines the phenotypic structure of bacterial community. *Microb. Ecol.*, 45, 384-398.

- Middelboe, M., Jørgensen, N.O.G., N., Kroer, 1996. Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of non-infected marine bacterioplankton. *Appl Environ. Microbiol.*, 62, 1991-1997.
- Monger, B.C. et Landry, M.R., 1993. Flow cytometric analysis of marine bacteria using Hoeschst 33342. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59,105-111.
- Murray, A.G., Eldrodge, P.M., 1994. Marine Viral Ecology: incorporation of bacteriophages into the microbial planktonic foodweb paradigm. *Journal of Plankton Research*, 16, 627-641.
- Nagat, T., Kirchman, D.L., 1992. Release of dissolved organic matter by heterotrophic protozoa: implications of microbial food webs. *Arch. Hydrobiol. Beich.*, 39, 99-109.
- Noble, R.T., J.A., Fuhrman, 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, 14, 113-118.
- Olson, R.J., Vaulot, D., S.W. Chisholm, 1985. Marine phytoplankton distribution measured using shipboard flowcytometry. *Deep Sea Res.*, 32, 1273-1280.
- Ooms-Wilms, A.L., 1997. Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes?. *Journal of Plankton research*, 19(8), 1125-1141.
- Pace, M.L., 1988. Bacterial mortality and the fate of bacterial production. *Hydrobiology*, 159, 41-49.
- Pace, M.L., Cole, J.J., 1996. Regulation of bacteria by resources and predation tested in whole-lake experiments. *Limnology et oceanography*, 41(7), 1448-1460.
- Paul, J.H., Jiang, S.C., Rose, J.B., 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2197-2204.
- Porter, K.G., 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food web. *Hydrobiology*, 159, 89-97.
- Porter, K.G., Sherr, E.B., Sherr, B.F., Pace, M., Sanders, R.W., 1985. Protozoa in planktonic food webs. *Journal Protozoology*, 32, 409-415.
- Portor, L.M. et Fuhrman, J.A., 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343, 60-62.
- Potter, D., Lajeunesse, T.C., Saunders, G.W., R.A., Andersen, 1997. Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoidpicoplankton. *Biodiv. Consev.*, 6, 99-107.
- Sanders, R.W., 1991. Mixotrophic protists in marine and freshwater ecosystems. *Journal. Protozool.*, 38, 78-81.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., 1984. Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystem. In: current perspectives in microbial ecology. Klug (M.J.), Reddy (C.A.), eds, Washington DC, American Society for Microbiology, 412-423.
- Sieburth, J.M.C., Smetace, K., Lenz, J., 1978. Pelagic Ecosystem Structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology Oceanography*, 23, 1256-1263.
- Šimek, K., Penrhtaler, J., Weinbauer, M.G., Hornak, K., Dolan, J.R., Nedoma, J., Masin, M., Amann, R., 2001. Change in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing on bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.*, 31, 123-135.
- Sime-Ngando, T., Bettarel, Y., Chartogne, C., Sean, K., 2003. The imprint of wild viruses on fresh water microbial ecology. *Recent Research Development in Microbiology*, 7, 481-497.
- Sime-Ngando, T., 1997. Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. *Ann. Biol.*, 36, 181-210.
- Smith, J.C., Plah, T., Li, W.K.W., Horne, E.P.W., Harrison, W.G., Subba Rao, D.V., B.D. Irwin, 1985. Arctic marine photoautotrophic picoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 20, 207-220.
- Srivastava, D. S., KOLasa, J., Bengtson, J., Gonzalez, A., Lawler, S.P., Miller, T.E., Manguia, P., Romanuk, T., Schneider, D.C., Trzcinski, M.K., 2004. Are natural microcosms useful model systems of ecology?. *Trends Ecol. Evol.*, 19, 379-384.
- Stockner, J.G., Porter, K.G., 1988. Microbial food webs in freshwater planktonic ecosystems. In: S.J. CARPENTER [ed]. *Complex interactions in lake communities*. Springer-Verlag, New York, 69-83.
- Suttle, C.A., Chan, A.M., Cottrell, M.T., 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature*, 347, 467-469.
- Thingstad, T.F., Lignell, R., 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbiology Ecology*, 13, 19-27.

- Thingstad, T.F., Zweifel, U.L., F. Rassolzadegan, 1998. Indications of P.Limitation for heterotrophic bacteria and phytoplankton in the N.W. Mediterranean summer surface waters. *Limnol. Oceanogr.*, 43, 88-94.
- Vaulot, D., 1989. CytoPC : processing software for flow cytometric data. *Signal Noise*, 2, 8.
- Weinbauer, M.G., Hofle, M.G., 1998. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factor controlling bacterioplankton production in Eutrophic lake. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 64.
- Weller, R., Glöckner, F.O., Amann, R., Simon, M., 1996. Identification *in situ* and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates. *Appl. Environ Microbiol*, 62, 1998-2005.
- Wetzel, R.G., 1983. *Limnology*. 2nd ed. Sanders.
- Wilhelm, S.W., Suttle, C.A., 1999. Viruses and nutrients cycles in the sea. *Biosciences*, 49, 781-788.
- Willimas, P.J le B., 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.*, 5, 1-28.
- Winter, C., Smit, A., Herndl, G.J., Weinbauer, M.G., 2004. Impact of virioplankton on archeal and bacterial community richness as assessed in sea water batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 804-813.
- Yannarell, A.C., Kent, A.D., Lauster, G.H., Kratz, T.K., Triplett, E.W., 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Appl. Environ. Microbiol*, 46, 391-405.

Tableau des valeurs fournies par l'OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development) pour évaluer le niveau trophique d'un lac. D'après le rapport

Catégorie trophique	P_{tot} ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Chl a ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		Secchi (m)	
		Moyenne	Maximum	Moyenne	Maximum
Ultra-oligotrophie	≤ 4	≤ 1	$\leq 2,5$	$\geq 2,5$	≥ 6
Oligotrophie	≤ 10	$\leq 2,5$	≤ 8	≥ 6	≥ 3
Mésotrophie	13 - 58	2,5 - 8	8 - 25	6 - 3	3 - 1,5
Eutrophie	35 - 100	8 - 25	25 - 75	3 - 1,5	1,5 - 0,7
Hypereutrophie	≥ 100	≥ 25	≥ 75	$\leq 1,5$	$\leq 0,7$

: Principe et mode opératoire du dosage chimique des éléments considérés dans l'expérience d'enrichissement

II.1 Carbone et azote particulaire

Principe : Mesurer des concentrations en carbone et azote particulaire après filtration, combustion et séparation par chromatographie gazeuse des échantillons.

Mode opératoire : Les échantillons ont été préalablement filtrés sur membranes Whatman GFF (0,7 μm). Les filtres contenant les particules ont été ensuite placés au dessiccateur avec de l'HCl, puis un dessiccateur du KOH. Les filtres ont été ensuite placés dans une petite capsule en étain. La capsule et l'échantillon ont été soumis, en présence d'O₂, à une combustion éclairée à 1000°C dans un tube en quartz. Les gaz de combustion ont été ensuite oxydés, réduits et séparés pour enfin être quantifiés.

II.2 Phosphore particulaire

Principe : L'analyse du phosphore particulaire présent dans un échantillon est effectuée par colorimétrie après minéralisation.

Mode opératoire : Les échantillons ont été filtrés sur des membranes en polycarbonate de porosité 0,4 μm . Le filtre placé dans l'eau distillée est sujet au même protocole que pour le phosphore total (décrit ultérieurement).

II.3 Azote ammoniacal NH_4^+

Principe : Le but est de former en milieu alcalin ($10,4 < \text{pH} < 11,5$) un composé de type indophénole par réduction des ions ammonium en présence d'un catalyseur. La coloration bleue est ensuite mesurée par spectrométrie.

Mode opératoire : 20 ml d'eau à analyser ont été mis en présence de deux réactifs (solution phénol-nitroprussiate et solution alcaline complexante et chlorée) pendant 6 heures à l'obscurité. Les échantillons colorés ont ensuite été mesurés au spectrophotomètre.

II.4 Azote nitreux NO_2^-

Principe : Diazotation de sulfanilamide par l'ion nitreux en présence de chlorhydrate d'N-éthylène-diamine. Le complexe rose ainsi formé a été mesuré par spectrophotométrie.

Mode opératoire : L'eau à analyser est mise en présence d'un réactif combiné (acide phosphorique, d'N-éthylène-diamine et sulfanilamide). Le temps de réaction a permis la formation d'un complexe de couleur rose et a été mesuré par spectrophotométrie.

II.5 Azote nitrique NO_3^{-2}

Principe : Les nitrates sont réduits en nitrite par passage sur une colonne de cadmium cuivrée. Le dosage s'effectue par colorimétrie.

Mode opératoire : L'échantillon disposé sur un carrousel a été prélevé par une pompe péristaltique ainsi que des réactifs mis en œuvres (sulfate de cuivre, chlorure d'aluminium et un réactif colorimétrique). La coloration résultant de la réaction est mesurée par spectrophotométrie.

II.6. Azote total (N total)

Principe : Analyse de toutes les formes azotées présentes dans un échantillon.

Mode opératoire : Les échantillons sont placés dans un passeur, aspirés et injectés dans un catalyseur à quartz dans un four chauffé à 1000°C. Toutes les formes azotées sont brûlées et oxydées. Après déshydratation de ces gaz, l'ozone est ajouté. L'azote gazeux est transformé en molécule instable (NO*) qui libère des photons et que l'on mesure avec une cellule photoélectrique. Les concentrations sont exprimées suivant une gamme étalon qui est définie à chaque mesure.

II.7 Orthophosphates PO₄³⁻

Principe : Formation d'un complexe de molybdate d'ammonium, de tartre double de potassium et d'antimoine-phosphore-molybdate. Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique.

Mode opératoire : L'eau à analyser a été mise en présence d'un réactif avec réducteur (acide ascorbique). Le complexe bleuté est analysé par spectrophotométrie.

II.8. Phosphore total (P total)

Principe: Analyse du phosphore total contenu dans un échantillon par colorimétrie après minéralisation.

Mode opératoire : l'eau à analyser a été mise en présence du persulfate d'ammonium à 20% et d'acide sulfurique pour la minéralisation. Ce dernier est accéléré par passage des échantillons à 128°C pendant une heure. Le dosage a été effectué suivant la méthode décrite pour les orthophosphates (voir ci-dessus).

II.9. Indice d'aromaticité (I.A.)

Principe : Du fait de l'absorbance des composés aromatiques dans les longueurs d'onde entre 250 et 280 nm, plusieurs auteurs ont utilisé un indice d'absorbance pour essayer d'estimer le contenu aromatique dans le COD, le contenu en acides fluviqques et la relation de la biodégradabilité de la matière organique. *Imai et al. (2001)* trouvent des relations de ces indices avec l'origine de la matière organique : la MOD allochtone est plus aromatique que la MOD autochtone (sécrétions photosynthétiques de dominance aliphatique, avec des indices plus bas).

On utilise donc, la propriété de l'absorbance dans les U.V. pour essayer de caractériser la MOD présente dans les échantillons du point de vue de sa biodégradabilité. La mesure d'absorbance s'effectue avec le spectrophotomètre.

I.A. ($\text{u.A.L.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) = ((Abs à 280 nm / [COD]) / L), L : longueur de la cuve d'absorption.

Biodégradabilité en relation avec l'absorption spécifique, d'après *Imai et al.* (2001)

Groupe selon biodégradabilité	% COD minéralisé	Indice d'aromaticité
1^e Elevée	60-90%	0,0050-0,0170
2^e Intermédiaire	15-35%	0,0200 - 0,0300
3^e Basse	< 10%	> 0,0300

Résultats décrivant l'évolution des différentes communautés autotrophes des deux lacs (Léman et Annecy) pour la fraction <math><1,2 \mu\text{m}</math>, obtenus par analyse en cytométrie, au cours de l'expérience d'enrichissement.

Description	Léman			Annecy		
	Syn/ml	Euk/ml	Perich/ml	Syn/ml	Euk/ml	Perich/ml
T0						
<math><11/t0/FN</math>	41,4	8,3	0,0	12	1	0
T1						
<math><11-C1/t1/FN</math>	17,6	0,0	0,0	9	0	1
<math><11-C2/t1/FN</math>	52,7	0,0	0,0	9	3	0
<math><11-C3/t1/FN</math>	35,2	0,0	0,0	4	0	0
<math><11-E1/t1/FN</math>	52,7	0,0	0,0	3	0	0
<math><11-E2/t1/FN</math>	70,3	8,8	0,0	9	0	0
<math><11-E3/t1/FN</math>	26,4	8,8	0,0	9	1	0
T2						
<math><11-C1/t2/FN</math>	70,3	0,0	0,0	10	0	0
<math><11-C2/t2/FN</math>	70,3	17,6	0,0	7	2	0
<math><11-C3/t2/FN</math>	17,6	0,0	0,0	7	0	0
<math><11-E1/t2/FN</math>	52,7	0,0	0,0	10	0	0
<math><11-E2/t2/FN</math>	17,6	0,0	0,0	6	0	0
<math><11-E3/t2/FN</math>	44,0	61,5	0,0	2	0	0
T3						
<math><11-C1/t3/FN</math>	61,5	0,0	0,0	3	0	0
<math><11-C2/t3/FN</math>	44,0	8,8	0,0	5	0	0
<math><11-C3/t3/FN</math>	52,7	35,2	0,0	0	0	0
<math><11-E1/t3/FN</math>	17,6	0,0	0,0	3	1	0
<math><11-E2/t3/FN</math>	17,6	0,0	0,0	3	1	1
<math><11-E3/t3/FN</math>	26,4	0,0	0,0	4	0	0

Résumé

Effet des virus et des protistes flagellés sur les ressources nutritives et sur la dynamique et structure de la communauté bactérienne lacustre

Nous avons tenté d'appréhender l'impact conjoint ou séparé des virus et des prédateurs flagellés sur la structure de la communauté bactérienne et sur la dynamique des ressources nutritives. Dans ce but deux expériences au mois de mars ont été conduites avec des échantillons provenant des eaux de surface des lac Léman (mésotrophe) et d'Annecy (oligotrophe). Au cours de chaque expérience, un enrichissement en particules virales dans des enceintes d'1L mises à incuber pendant 4 jours, *in situ*, a été effectué en présence et en absence des prédateurs flagellés. L'analyse en cytométrie en flux, nous a permis d'effectuer un suivi journalier de l'évolution de l'abondance bactérienne et virale. Les changements dans la structure de la communauté bactérienne ont été appréhendés à partir de la méthode TSA-FISH au début et à la fin de l'expérience. Nos résultats ont révélé un impact faible de la prédation et de la lyse virale sur la structure de la communauté bactérienne masquée par la stabilité de leur abondance. Les analyses des différents éléments chimiques effectuées au cours de cette étude n'ont pas permis de mettre en évidence l'importance de la lyse virale sur le renouvellement des nutriments en milieu oligotrophe (lac d'Annecy). La température hivernale très froide semble avoir été un facteur clef de la régulation de la dynamique et de la diversité microbienne.

Mots Clés : Bactéries, virus, Structure de la communauté bactérienne, prédation, lyse virale, FISH

Abstract

Assessing the role of viruses and flagellated protozoan on bacterial diversity and resources dynamics in two contrasted alpine lakes

An attempt has been made to assess the impact of viruses and flagellated protozoan on both the dynamics and diversity of bacterioplankton as well as on nutrient dynamics. Two experiments have been conducted on surface waters of Lake Geneva (mesotrophic) and Lake Annecy in March, consisting in the enrichment of 1 L bottle with viruses in the presence or absence of the potential predators. Flow cytometry was used to follow daily microbial dynamics whereas the structure of the eubacterial community was analysed using the TSA-FISH method at the beginning and the end of each experiment which lasted 4 days. We observed only a small impact of either predation or viral lysis on the structure of the bacterioplankton. There was no significant effect of the viruses or the predators on the nutrient dynamics. Temperature was likely the main factor at this period of the year explaining the regulation of the microbial loop.

Key Words: Bacterioplankton, viruses, structure of bacterial community, predation, viral lysis, FISH

