

Etude de la dynamique et de l'importance fonctionnelle des virus bactériophages du lac du Bourget

Rozenn Thomas

► To cite this version:

Rozenn Thomas. Etude de la dynamique et de l'importance fonctionnelle des virus bactériophages du lac du Bourget. Biodiversité et Ecologie. 2008. hal-02818475

HAL Id: hal-02818475 https://hal.inrae.fr/hal-02818475

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.





UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS VI

Mémoire de Master Mention : Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie Spécialité : Océanographie et Environnements Marins Année 2 2007 – 2008

Rozenn THOMAS

Etude de la dynamique et de l'importance fonctionnelle des virus bactériophages du lac du Bourget



Responsable scientifique : Dr Stéphan Jacquet

Laboratoire de

UMR CARRTEL : Centre Alpin de Recherche sur les Reseaux Trophiques des Ecosystèmes Station d'hydrobiologie lacustre de Thonon les bains

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS
1. INTRODUCTION
2. MATERIELS ET METHODES 5
2.1. Site d'étude et stratégie d'échantillonnage
2.2. Mesures physico-chimiques
2.3. Principe de la cytométrie en flux et comptages particulaires
2.4. Préparation des échantillons issus des expériences pour l'analyse en cytométrie
2.5. Viabilité bactérienne
2.6. Production bactérienne <i>via</i> l'incorporation de $[^{3}H]$ leucine
2.7. Mesure de la diversité bactérienne par PCR-DGEE (Polymerase Chain Reaction -
Denaturing gradient gel electrophoresis)
2.8. Mesure de la production virale
2.9. Mesure du déclin viral
2.9.1. Méthode basée sur la filtration (Noble et Furhman, 1997) 12
2.9.2. Méthode basée sur l'utilisation de cyanure de potassium (Heldal et Bratbak 1991). 12
2.10. Calcul du ratio Virus/bactéries et du taux de contact entre virus et bactéries
2.11. Principe de la microscopie électronique à transmission et mesure de la mortalité
bactérienne imputable à la lyse virale
2.12. Induction du cycle lytique avec la mitomycine C, mesure de la fraction bactérienne
lysogénique
2.13. Calcul du carbone libéré par la lyse
2.14. Analyses statistiques
3. RESULTATS
3.1. Contexte environnemental des communautés microbiennes
3.1.1. Evolution de la température
3.1.2. Evolution de la concentration en oxygène dissous
3.1.3. Evolution de la concentration en chlorophylle a
3.1.4. Evolution de la concentration des nutriments inorganiques et du COD
3.2. Evolution de la communauté bactérienne hétérotrophe
3.2.1. Evolution des abondances
3.2.2. Evolution de la proportion des cellules actives
3.2.3. Evolution de la production bactérienne carbonée
3.2.4. Modification de la structure de la communauté bactérienne 18
3.3. Evolution de la communauté virale
3.3.1. Evolution des abondances 18
3.3.2. Mesure de la production virale 18
3.3.3. Mesure du taux de déclin 19
3.4. Impact fonctionnel des virus bactériophages
3.4.1. Le ratio virus/bactéries (VBR)
3.4.2. Le taux de contact entre les particules (CR)
3.4.3. Fréquence de cellules bactériennes infectées (FIC). charge virale et VIBM
3.4.4. Fréquence de bactéries lysogènes (FLC).
3.4.5. Carbone libéré par la lyse virale 20
4. DISCUSSION
BIBLIOGRAPHIE
ANNEXES

REMERCIEMENTS

Je tiens particulièrement à remercier Stéphan Jacquet pour sa disponibilité et la qualité de son encadrement. Ainsi que pour tout ce qu'il m'a apporté durant ce stage. Je souhaite à chaque étudiant de pouvoir bénéficier de tuteur aussi efficace, dynamique et passionné.

Merci également à l'ensemble des membres de la station d'Hydrobiologie lacustre de Thonon, pour leur accueil et leur gentillesse.

Je remercie l'équipe de microbiologie aquatique (maintenant Biofeel) de m'avoir accepté au sein de l'équipe. Aussi, le travail n'aurait pas été réalisé sans la présence de Pascal Perney qui a effectué tous les prélèvements sur le lac du Bourget et qui m'a permis d'avancer très vite dans les mesures de production bactérienne. Je tiens également à remercier Brigitte Leberre pour son aide en biologie moléculaire et bien sûr sa sympathie et ses précieuses explications.

Merci à mon père pour son aide en microscopie et le temps qu'il y a consacré.

Merci à tous les stagiaires (les châtelains) pour ces moments inoubliables : mam' rangement (ma ptite Aude), mam' patate (ma ptite Fatma), mam' chicon (ma ptite Laura bientôt championne de marathon), le percé tatoué (msieu Mike !).

Bien sûr je remercie les thésards, msieu pollet pour son soutient, sa bonne humeur, sa gentillesse, son aide... Anne et Lyria pour les bons moments que j'ai passé à rigoler.

GLOSSAIRE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomal AFNOR : Association Française de NORmalisation **BA** : Bacterial abundance BGE : Bacterial Growth Efficiency COD : Carbone Organique Dissous CTC: 5-Cyano-2,3-ditolyl Tretrazolium Chloride CTD : Conductivity Temperature Depth CR : Contact Rate DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis DI : Dilution Isotopique DNA : Desoxyribo Nucleic Acid FIC : Frequency of Infected Cells FLC : Frequency of Lysogenic Cells FVIC : Frequency of Visible Infected Cells HBACT : Heterotrophic bacteria HDNA : High DNA KCN : Cyanure de potassium LDNA: Low DNA MET : Microscopie Electronique à Transmission MMC : Mitomycine C MOD : Matière Organique Dissoute NADS : Nucleic Acid Double Staining OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Economiques **PB** : Production Bactérienne Pb : Paire de bases PCR : Polymerase Chain Reaction PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis PI: Propidium Ionide PM : Poids Moléculaire PV : Production virale RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

TCA : acide TriChloroAcétique TE : Tris EDTA UV : Ultra Violet VA : Viral abundance VBR : Virus to Bacterium Ratio VIBM : Virus Induced Bacterial Mortality VLP: Virus Like Particule

1. INTRODUCTION

Il est aujourd'hui bien établi que l'on ne peut prétendre comprendre le rôle du vivant dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques sans répondre à un certain nombre de questions fondamentales telles que celles portant sur les relations trophiques existantes et s'opérant entre les différents organismes. En 1983, Azam et al. proposèrent une modification du concept de la chaîne alimentaire classiquement décomposée en quatre compartiments (phytoplancton, zooplancton, poissons planctonophages et poissons piscivores). En effet, ils mirent en avant et introduisirent dans ce schéma le compartiment bactérien et la notion de boucle microbienne (Figure 1), composée à la fois, des bactéries hétérotrophes (de taille comprise entre 0,2 et 2 µm), du picoplancton autotrophe ainsi que du nano- et microplancton hétérotrophe, les flagellés et les ciliés (caractérisés par des gammes de taille variant entre 2 et 200 µm). L'intégration de la boucle microbienne au sein des réseaux trophiques se révéla dans les années qui suivirent essentielle, d'une part par les organismes qui la composent et d'autre part d'un point de vue fonctionnel. Il fut démontré qu'une proportion non négligeable (10-20%) de la production primaire était incorporée par le bactérioplancton (Azam et al. 1983) à travers l'utilisation de composés dissous issus de la production primaire et que ces bactéries étaient la proie de prédateurs flagellés et/ou ciliés (Azam et al. 1983). Cela permit alors de mieux comprendre le recyclage de la matière organique issue de la production primaire vers les échelons trophiques supérieurs.

En dépit de l'intégration, désormais admise, des composantes de la boucle microbienne dans l'ensemble des réseaux trophiques, les tentatives de modélisation des flux de matière et d'énergie entre matière organique dissoute, bactéries et protozoaires ainsi que la régulation de certaines biomasses planctoniques par les processus Top-down (prédation) et Bottum-up (ressource) révélèrent un désaccord avec ce qui se produit réellement dans le milieu naturel (Sime-Ngando, 1996). Ceci laissait encore soupçonner l'existence d'autres facteurs ou processus de régulation intervenant dans les flux de matière (Servais *et al.*, 1985, McManus et Fuhrman, 1988, Pace, 1988, Sherr *et al.*, 1988, Sime-Ngando, 1996).

La découverte des virus et de leur forte abondance au sein des milieux aquatiques (Torella et Morita, 1979, Bergh *et al.*, 1989, Suttle *et al.*, 1990, Fuhrman, 1992) a permis de modifier la vision que l'on avait de la boucle microbienne, notamment au travers de l'impact potentiel de ces virus sur les différentes communautés microbiennes. Découverts au début du

siècle dernier par William Twort en 1915 et Felix d'Herelle en 1917, ce n'est pourtant qu'en 1989 que Bergh *et al.* ont véritablement révélé l'importance des virus dans les écosystèmes aquatiques. Suite à leur étude publiée dans la prestigieuse revue *Nature*, l'écologie virale est devenue une science à part entière et a commencé à prendre de l'ampleur (figure 2). Aujourd'hui l'écologie virale aquatique constitue une discipline en plein essor grâce, entre autre, à l'avancée des nouvelles techniques d'étude (*i.e.* la métagénomique, la RAPD, la PCR-DGGE, ou encore la PFGE après la cytométrie en flux, la microscopie à épifluorescence et la microscopie électronique à transmission). Cette avancée a été particulièrement marquée dans le domaine marin. Une simple recherche sur le « Web of Science » révèle en effet le passage de 1-2 articles publiés par an à la fin des années 1980 à 20-30 articles dans les années 1990 pour aboutir à plus de 100 articles publiés par an depuis 2004. Les citations de ces articles ont aussi augmenté de manière exponentielle avec plus de 3500 citations en 2006. Comparativement, on dénombre environ 30 articles publiés par an et un peu plus de 400 citations depuis 2004 dans le domaine de l'écologie virale des eaux douces (Middelboe *et al.* 2008).

Actuellement, les questions posées par la communauté scientifique travaillant dans le domaine de l'écologie virale aquatique sont nombreuses et portent sur l'abondance, la distribution, les cycles de vie (figure 3), la diversité ou encore le rôle fonctionnel de ces particules. L'intérêt porté aux virus aquatiques est tout d'abord justifié de par le fait qu'il s'agisse du groupe « biologique » le plus abondant de la biosphère, avec des concentrations atteignant typiquement 10^7 à 10^8 particules par millilitre d'eau (Fuhrman et Suttle 1993, Wommack et Colwell 2000, Sime-Ngando et al. 2003, Weinbauer 2004). Ces virus sont les plus petites entités biologiques connues à ce jour avec une taille variant généralement entre 20 et 200 nm (majorité <60 nm) bien que l'on découvre régulièrement ce que l'on appelle des virus géants, dont la taille dépasse largement 200 nm (http://www.giantvirus.org). Parallèlement à ce constat, il est admis que les bactéries sont les cellules les plus abondantes des systèmes aquatiques, si bien que la majeure partie de la communauté virale est probablement composée pour l'essentiel de bactériophages (Fuhrman 1999, Wommack et Colwell 2000, Weinbauer 2004). Ils jouent donc sans nul doute un rôle essentiel sur la structure et le fonctionnement des microorganismes au sein des écosystèmes aquatiques à commencer par les procaryotes. Il est reconnu que les virus puissent intervenir dans de nombreux processus écologiques et biogéochimiques, tels que le recyclage des nutriments et la mortalité planctonique (Wilhelm et Suttle, 1999, Wommack et Colwell 2000). On comprend ainsi que la prise de conscience de l'importance des virus dans les milieux aquatiques a bouleversé en partie la compréhension du fonctionnement des écosystèmes, à commencer par la dynamique des composantes de la boucle microbienne. L'infection et la lyse des bactéries par les virus (responsables de 10 à 50% de la mortalité bactérienne) peuvent par exemple court-circuiter la boucle microbienne en empêchant le transfert des éléments recyclés par les bactéries vers les échelons trophiques supérieurs (court-circuitage pouvant atteindre 25%, d'après le modèle Wilhem et Suttle, 1999). (Figure 1). Les cellules lysées n'étant pas broutées, elles alimenteraient plutôt le réservoir de la matière organique dissoute qui profiterait à nouveau au bactérioplancton (Suttle *et al.*, 1990, Fuhrman, 1992) (Figure 1).

Outre cet impact sur les abondances et la diversité bactériennes (Torella et Morita, 1979, Bergh et al., 1989, Hennes et Simon, 1995, Weinbauer et Suttle, 1996), la lyse virale aurait également un impact à chaque niveau trophique de la boucle microbienne (Proctor et Fuhrman, 1990, Suttle et Chan, 1993, Suttle et al., 1990, Cottrell et Suttle, 1991, Nagasaki et al., 1994, Garza et Suttle 1995). En 1997, Thingstad et Lignell ont formulé un concept original appelé « killing the winner » (« que le meilleur soit tué ») postulant que l'impact de la lyse virale aurait aussi un effet potentiel sur la composition, la structure et la diversité bactérienne. Dans la théorie du « killing the winner », les virus lytiques tuent les organismes les plus abondants car la probabilité de rencontre est plus importante que dans le cas de populations faiblement représentées. De la sorte, le maintien de la diversité bactérienne est assuré de par la coexistence des populations minoritaires qui échappent à la lyse virale. Quelques études expérimentales, au laboratoire ou in situ ont corroboré ce concept (Middelboe et al., 2008, Bouvier et al., 2007). Dans les eaux douces, l'incubation d'un échantillon rempli de bactéries avec ou sans les virus provenant du même milieu se traduit par des changements dans les abondances, les taux de croissance et la diversité bactérienne (Weinbauer et Hoffle, 1998, Suttle, 1992, Peduzzi et Weinbauer, 1993). Cependant, un événement massif de lyse pourrait également être profitable pour la communauté bactérienne via la libération de matière organique (Berdjeb, non publié). De la même façon, sa structure peut être modifiée de façon notable (Van Hannen et al., 1999).

Bien qu'il soit reconnu que le rôle des virus soit essentiel dans le contrôle de la dynamique et de la diversité des procaryotes, l'étude de leur propre dynamique en tant que particules virales à part entière reste limitée. Ceci est d'autant plus vrai pour les milieux continentaux (typiquement les lacs) et notamment en France. Dans le cadre de ce projet de

Master (qui fait partie intégrante du projet AQUAPHAGE financé par une ANR Biodiversité), l'objectif a été de réaliser le suivi de la dynamique des communautés virales et bactériennes du lac du Bourget, le plus grand lac naturel français, entre les mois de janvier et mai 2008. Depuis 2003, ce lac fait l'objet d'un suivi de l'abondance de ces communautés planctoniques, mais la dynamique du compartiment viral, sa diversité et son impact sur la communauté bactérienne n'ont pas encore été clairement établis. Les questions fondamentales auxquelles nous avons tenté de répondre ont donc été les suivantes :

- 1) Quelles sont l'abondance et la dynamique des virus bactériophages ?
- 2) Quel est l'impact des virus bactériophages sur la communauté bactérienne ?

3) Quel est l'impact des virus bactériophages sur la redistribution des éléments nutritifs ? Dans cette optique, le suivi des communautés a été effectué à deux profondeurs caractéristiques de la colonne d'eau, soit à 2 m (épilimnion) et 50 m (hypolimnion) et une batterie d'expériences et/ou d'analyses a été réalisée afin de déterminer : la production virale, le temps de génération des particules (turnover), le déclin viral, le pourcentage de bactéries lysogènes, le pourcentage de bactéries infectées, la diversité bactérienne, la production bactérienne, la viabilité bactérienne et enfin la mortalité bactérienne imputable à la lyse virale.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Site d'étude et stratégie d'échantillonnage

Le lac du Bourget (45°44'N, 05°51'W, 231,5m d'altitude) est un lac péri-alpin, né il y a 19 000 ans de la fonte des glaciers alpins. De forme allongée (18 km de longueur pour 3,4 km de largeur), et orienté selon un axe Nord-Sud, il est le plus grand lac naturel entièrement français. Il est caractérisé par une superficie de 44,5 km² et un volume d'eau de 3,6 milliards de m³. Sa profondeur moyenne est de 80 m et sa profondeur maximale de 147 m. Le temps de résidence de ses eaux est d'environ 8,5 ans (Jacquet et al., 2008). Il est alimenté majoritairement par trois rivières, la Leysse (65% des apports), le Sierroz (25% des apports) et le Tillet (10% des apports) selon une estimation faite sur les quatre dernières années. Le canal de Savières (exutoire) contribue à moins de 1,5% des apports lors des crues du Rhône. Le statut trophique du lac Bourget est mésotrophe suivant les critères de l'OCDE (1982), notamment pour le phosphore (Ptot = 22 μ g.L⁻¹ et P-PO₄=14 μ g.L⁻¹ en 2007). Au cours des années 1970, de grands travaux ont été réalisés par les communes du bassin versant du lac afin de le protéger, de l'assainir et pour lutter contre le processus d'eutrophisation. Depuis 2004, ce lac fait l'objet d'un suivi régulier des paramètres physico-chimiques et des principaux compartiments biologiques. Il a été étudié plus sporadiquement avant cette date mais à de nombreuses reprises (Jacquet et al., 2005).

L'échantillonnage a été réalisé au niveau de la station B (site de référence, au milieu du lac, Figure 4). Les prélèvements nécessaires à la réalisation de nos expériences ont été effectués à 2 m (épilimnion) et à 50 m (hypolimnion) de profondeur en 2008 les 17 janvier, 7 février, 13 mars, 1^{er} avril et 16 avril. Pour chacune de ces deux profondeurs, 5 litres d'eau ont été échantillonnés (échantillonnage discret) de manière à mener l'ensemble des expériences résumées dans la Figure 5 et expliquées ci-après. Aucun prélèvement n'a pu être traité au mois de mai pour des raisons logistiques.

2.2. Mesures physico-chimiques

Les mesures physico-chimiques ont été acquises par une sonde CTD mesurant la conductivité, la profondeur et la température. La sonde était munie d'un capteur de mesure de fluorescence de la chlorophylle *a* et d'oxygène dissous. Les données ont été vérifiées par la Cellule Technique du lac du Bourget (Communauté d'Agglomération du lac du Bourget). Par ailleurs, la détermination des éléments nutritifs : l'azote ammoniacal (N-NH₄), l'azote nitritique (N-NO₃), les ortho phosphates (P-PO₄) et la silice réactive (SiO₂), a été effectuée par le laboratoire de chimie de l'INRA selon les protocoles standardisés dans le cadre des Normes AFNOR.

2.3. Principe de la cytométrie en flux et comptages particulaires

La cytométrie en flux est un instrument de mesure permettant le dénombrement rapide d'un grand nombre de particules ou cellules (idéalement entre 100 et 600 évènements.s⁻¹) en suspension dans un liquide et la discrimination de sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de « taille ». Utilisée d'abord pour la recherche médicale en immunologie (Shapiro 1988), elle a ensuite été appliquée en océanographie pour énumérer les populations phytoplanctoniques (Olson et *al.* 1985), puis pour analyser les communautés bactériennes hétérotrophes (Monger et Landry 1993, Marie et *al.* 1996,7). Depuis 1999, il est également possible de discriminer et compter plusieurs groupes viraux (Marie et *al.* 1999, Larsen *et al.* 2004, Duhamel et Jacquet 2006).

Le cytomètre en flux utilisé au cours de cette étude a été un FACSCalibur (Becton Dickinson), équipé d'une source laser de puissance 15 mW à la longueur d'onde fixe de 488 nm. Le principe de fonctionnement de la cytométrie en flux réside sur la mise en pression d'un liquide de gaine d'entraînement de telle manière que les particules en suspension dans l'échantillon se retrouvent aspirées puis 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 individuellement 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) ou SSC (Side Scatter) est obtenu grâce à un photomultiplicateur placé à 90° via un

premier miroir dichroïque. L'état excité des cellules est un état instable, 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 phycocyanine). Ces signaux sont 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 électrique.

Les acquisitions ont été menées en utilisant un débit moyen calculé avant chaque manipulation (32,9-37,5 µl.min⁻¹) pour compter les bactéries hétérotrophes et les virus préalablement fixés, dilués puis marqués. 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, de taille et de granulométrie. L'analyse a été réalisée au moyen du logiciel CYTOWIN (Vaulot, 1989) disponible gratuitement à l'adresse suivante : <u>http://www.sbroscoff.fr/Phyto/cyto.htlm#cytowin</u> (figure 6).

2.4. Préparation des échantillons issus des expériences pour l'analyse en cytométrie

Les échantillons ont été fixés au glutaraldéhyde 1% de concentration finale pendant 15 minutes à l'obscurité, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Au moment de leur analyse, ils ont été décongelés rapidement (2 minutes dans un bain à 37°C). Plus précisément, la préparation des échantillons pour l'analyse en cytométrie a été réalisée suivant le protocole décrit dans Marie et *al.* (1999). Chaque échantillon a été dilué au 1/100^e pour les virus et au 1/50^e pour les bactéries dans une solution de TE à pH=8 (Tris EDTA) filtré à travers 0,02 µm. Un standard interne (billes Polysciences de 1 µm de diamètre) a été ajouté dans chaque tube d'analyse afin de vérifier l'alignement du laser, l'état du fluide et pour normaliser les différents paramètres. Les bactéries et les virus ne présentant pas de fluorescence naturelle, un marquage au fluorochrome SYBR Green I (Molecular probes) (dilué au 1/10000^e final) est nécessaire. Il s'agit d'un intercalant de l'ADN. Pour l'analyse des virus, l'échantillon a été chauffé à 75°C pendant 10 minutes pour optimiser le signal (Brussard 2004, Duhamel et Jacquet 2006). Le temps de marquage est le même pour tous les échantillons, soit 30 minutes.

2.5. Viabilité bactérienne

Deux colorants ont été testés puis utilisés afin d'apprécier la viabilité des cellules bactériennes : le CTC (5-Cyano-2,3diotolyl Tetrazolium Chloride) et le PI (Iodure de propidium). Le marquage à l'iodure de propidium doit permettre de détecter les cellules ayant une membrane altérée. En effet, ce colorant pénètre à travers la membrane cytoplasmique lorsqu'elle est poreuse donc altérée puis il colore les acides nucléiques. Ce colorant fluoresce dans le rouge. Dès la réception des échantillons, 5 μ l ont été marqués avec 2,5 μ l de PI (10 μ g.ml⁻¹ final). Un double marquage a été effectué avec 2,5 μ l de Sybr Green I (1/10000 final) puis 245 μ l de tampon TE filtré sur 0,2 μ m selon le protocole NADS (Barbesti et *al.*, 2000). Un contrôle négatif fixé avant coloration afin de « tuer » les cellules a aussi été réalisé (gultaraldéhyde 1% final puis fixation pendant 15 minutes). L'échantillon fixé était ensuite coloré et incubé exactement comme les échantillons tests, soit 30 minutes. Tous les échantillons marqués au PI sont analysés directement au cytomètre en flux.

Le marquage au CTC permet d'accéder aux bactéries qui respirent, dit autrement, les cellules marquées au CTC sont viables. Le protocole de marquage au CTC a été optimisé durant ce stage. En effet, la concentration optimale ainsi que le temps de coloration au CTC ont nécessité des modifications vis-à-vis de la littérature et les tests suivants ont été réalisés :

- Tests de concentrations : 5-5,5-6-7-7,5-10mM
- Tests de temps d'incubation : 15 minutes, 30 minutes, 1h, 3h30 et 5h
- Tests de congélation à l'azote liquide ou analyse directe
- Tests pour le contrôle négatif : glutaraldéhyde 1% final et 2% final et chauffage 30 minutes à 70°C.

Dès réception des échantillons, 0,9 ml d'échantillon a été marqué avec 0,1 ml de CTC (5 mM final). L'échantillon a été homogénéisé puis incubé pendant 5 h au noir à température ambiante (Falcioni et *al.* 2008, Del Giorgio et Gasol 2006). Puis les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide avant leur conservation à -80°C. Un contrôle négatif a été réalisé, soit 0,9 ml de l'échantillon chauffé à 70°C pendant 30 minutes afin de tuer les cellules auquel on a ajouté ensuite 0,1 ml de CTC. L'analyse au cytomètre a été faite comme précédemment puisque le CTC fluoresce également dans le rouge. (Figure 7).

2.6. <u>Production bactérienne via l'incorporation de [³H] leucine</u>

La production bactérienne a été mesurée grâce à l'incorporation de [³H] leucine d'après Fuhrman et Azam (1980). Une solution fraîche de leucine a été préparée au démarrage de ce travail et la concentration saturante a été déterminée. Nous avons décidé de travailler avec une concentration finale de 80 nM. A chaque date de prélèvement et pour chacune des deux profondeurs 2 m et 50 m, des triplicats ont été réalisés ainsi que deux témoins en duplicats (soit 10 échantillons au total pour chaque campagne). Brièvement, 1 ml d'échantillon témoin a été fixé avec du formaldéhyde (1,9% final) avant l'ajout de la leucine afin de les fixer directement pour avoir l'activité des cellules initiales. Puis, 10 µl de Leucine ont été injectés. Après homogénéisation, une incubation de 2 h au noir a été réalisée. La réaction a été stoppée avec du formaldéhyde (1,9 % final) dans les échantillons non témoins. Suite à cela, les échantillons ont été filtrés sur 0,2 µm, (diamètre 25 mm) et rincés avec de l'eau milliQ. Après filtration, 5 ml de TCA (5%) ont été ajoutés afin de casser les cellules. Après une incubation de 10 minutes, l'étape précédente a été répétée. Après séchage des filtres, 1 ml de soluène a été ajouté afin de dissoudre les filtres pendant 5 minutes puis 3 ml de cocktail scintillant (Hionic fluor) ont été également ajoutés. Une incubation de 12 h à 4°C a ensuite été effectuée. Suite à cela, les échantillons ont été passés au compteur à scintillation puis analysés. Pour calculer la production bactérienne, la formule suivante a été utilisée (Kirchman et *al.* 1985).

$$PB = VLeucine \times PM \div (\%Leu) \times (C / P) \times DI \div 10^{3}$$

Avec :

PB : production bactérienne en mg C l⁻¹ h⁻¹

V Leu : vitesse d'incorporation de la leucine en pmol.l⁻¹

PM : poids moléculaire de la leucine = 131,2

%Leu : fraction de la leucine dans les protéines = 0,073

C/P: rapport carbone cellulaire sur poids des protéines = 0,86

DI : dilution isotopique = 2

$$VLeu = V^{3}HLeu \times ([^{F}Leu] + [^{3}HLeu]) \div [^{3}HLeu]$$

Avec :

[^FLeu] est la concentration de la leucine froide ajoutée et [³H-Leu] est la concentration de leucine radioactive ajoutée.

$$VLeu = V^{3}HLeu \times 4,5.10^{-13}$$

Avec :

V³H-Leu : vitesse d'incorporation de ³H -leucine en pmol.l⁻¹.h⁻¹

$$V^{3}HLeu = ((dpme - dpmt) \div 141 \times V \times T)$$

Avec :

dpm : désintégrations par minute mesurées sur l'échantillon (e) et sur le témoin (t) et V le volume d'incubation soit 0,001 L et T le temps d'incubation soit 2 h.

A partir des mesures de production bactérienne, il a été possible d'estimer la demande bactérienne en carbone au moyen du calcul suivant :

demande en carbone = \Pr oduction bacterienne ÷ BGE

Avec :

La production bacétrienne en µg C.l⁻¹.j⁻¹

Le BGE (Bacterial Growth Efficiency) = 0,5 (Wilhelm et Suttle, 2000)

2.7. <u>Mesure de la diversité bactérienne par PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction -</u> Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Cette technique a été établie et optimisée par un certain nombre d'auteurs (Giovannoni et *al.* 1990, Ward et *al.* 1990, Muyzer et *al.* 1993, Ludwig and Schleifer 1994, Amann, 1995, Head et *al.* 1998) de manière à évaluer la « diversité » des bactéries (*i.e* structure de la communauté) dans les écosystèmes naturels sans étape de mise en culture (mais directement à partir de l'extraction d'ADN des populations naturelles). L'identification est basée sur le gène codant pour l'ADN ribosomal 16s. Au préalable, une PCR est réalisée afin d'amplifier les fragments d'ADNr 16s de même taille (590 pb) mais de séquences différentes. Dans un gel DGGE, les fragments d'acides nucléiques sont soumis à différentes concentrations de dénaturant (mélange d'urée formamide). Lorsque le Tm (température de fusion dépendante du nombre de liaisons hydrogènes entre les bases azotées) est atteint, le fragment se dénature partiellement, ce qui stoppe sa migration (Ercolini 2004). Les fragments d'ADNr 16s de mêmes tailles mais de compositions différentes en paires de bases auront ainsi des profils de migration différentes (figure 8). Ces aspects théoriques ont été préalablement décrits par Fisher et Lerman (1983).

L'analyse a été effectuée suite à la préfiltration sur un filtre 2 μ m, 47 mm puis la filtration sur 0,2 μ m, 47 mm de 500 ml d'échantillon du lac provenant de 2 m et 50 m. Les filtres de 0,2 μ m contenant les concentras bactériens ont été récoltés puis préservés à -20°C avant analyse. Le protocole depuis l'extraction jusqu'à la DGGE est détaillé en annexe 7. L'analyse DGGE a été effectuée à l'aide du logiciel Kodak (1D 3.6 Image Analysis Software).

L'évolution de la structure de la communauté bactérienne a été évaluée en fonction du temps et de l'espace. L'indice de diversité de Shanonn-Weaver nous a permis d'évaluer la diversité de la communauté procaryotique tout en restant prudent sur la notion d'espèces car la DGGE ne donne pas le nombre d'espèces mais un nombre de génotypes différents. Cet indice a été calculé selon la formule suivante :

$$H' = -\sum ((N_i \div N) \times \log_2(N_i \div N))$$

Avec Ni le nombre de « génotypes » de la communauté et N le nombre total de « génotypes ».

2.8. Mesure de la production virale

Le taux de production virale a été déterminé via la production de nouvelles particules virales à partir de la dilution de la communauté microbienne *in situ* selon la méthode de Wilhelm et al. (2002). Un échantillon de 300 ml d'eau pour chaque profondeur a été filtré à travers 0,2 µm (filtre Millipore polycarbonate de diamètre 47mm) afin d'éliminer les particules virales libres. Après filtration, l'échantillon a été dilué avec de l'eau ultrapure (<30 KDa, exempte de particules virales) issue du même lac afin de maintenir un volume final de 300 ml au dessus du filtre. L'échantillon final contenait donc la fraction bactérienne (> 0,2 µm) ainsi que 17% de particules virales de l'abondance initiale (estimées par le volume restant non filtré, soit environ 50 ml). Ce volume d'eau a été placé dans un flacon stérile à l'obscurité et à température ambiante. Des triplicats de 2 ml ont été prélevés à T0, T3h, T6h, T12h et T24h puis fixés au glutaraldéhyde (1% final) pendant 15 minutes avant d'être congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. L'analyse des virus a été effectuée par comptage des particules en cytométrie en flux. Le taux de production virale a été estimé par la pente de la droite de régression de l'abondance virale par ml en fonction du temps et en prenant en compte le facteur de dilution de 1/6^{ème}. La valeur de production est ensuite corrigée par la perte bactérienne (résultant de la filtration) entre l'abondance bactérienne à T0 dans l'échantillon et l'abondance bactérienne in situ correspondant à la période d'étude (figure 9).

Le « turnover » viral a été déterminé à partir du rapport entre l'abondance virale et la production virale.

Turnover
$$(h) = Abondance$$
 virale à $T0 \div Production$ virale

Avec :

Abondance virale en Particules.ml⁻¹

Production virale en Particules.ml⁻¹.h⁻¹

2.9. Mesure du déclin viral

Deux méthodes indépendantes ont été testées pour obtenir une estimation du déclin viral :

2.9.1. Méthode basée sur la filtration (Noble et Furhman, 1997)

45 ml de chaque échantillon (pris à 2 et 50 m) ont été préfiltrés à travers 2 μ m, afin d'éliminer les plus grosses particules puis à travers 0,2 μ m pour ne conserver que les virus. Le filtrat <0,2 μ m ainsi récupéré était donc exempt de bactéries et ne contenait que les particules virales libres dans le milieu. A différents temps après filtration (T0, T3h, T6h, T12h et T24h), 2 ml de chaque échantillon ont été prélevés, fixés au glutaraldéhyde (1% final) pendant 15 minutes, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Au moment de l'analyse, les échantillons ont été rapidement décongelés. Le déclin viral (en h⁻¹ puis converti en j⁻¹) a été calculé grâce à la pente de la droite de régression du log de l'abondance en fonction du temps (Figure 10).

2.9.2. Méthode basée sur l'utilisation de cyanure de potassium (Heldal et Bratbak 1991)

Le déclin viral a aussi été déterminé après inhibition de la production de nouveaux virus par l'ajout de cyanure de potassium (KCN) qui inhibe la respiration cellulaire soit ici les hôtes bactériens. Deux concentrations finales de KCN ont été testés : 1 et 2 mmol.l⁻¹ (après ajustement du pH à la valeur 7). A chaque profondeur, un contrôle négatif sans KCN a également été réalisé. A différents temps après traitement (T0, T3h, T6h, T12h et T24h) des triplicats de 2 ml de chaque échantillon ont été fixés au glutaraldéhyde (1% final) pendant 15 minutes puis congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant leur analyse en cytométrie en flux après décongélation. Le déclin viral a été calculé de la même façon que précédemment (Figure 10).

2.10. Calcul du ratio Virus/bactéries et du taux de contact entre virus et bactéries

Le ratio Virus/bactéries (VBR) est un indicateur des relations entre virus et bactéries. Un autre paramètre a pu être mesuré à partir de ceux préalablement définis, comme le taux de contact théorique entre virus et hôtes bactériens selon la formule suivante,

$$CR = (2S \times \prod \times W \times D)VA \times BA$$
 (Murray et Jackson, 1992)

Avec :

S = nombre de Sherwood (1,06 selon Wilhelm et *al.*, 1998)

W = diamètre moyen estimé d'une bactérie $(0,45 \times 10^{-4} \text{ cm selon Lee et Fuhrman}, 1987)$

D = diffusivité des virus $(3,456.10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ j}^{-1} \text{ selon Murray et Jackson 1992})$

 $VA = abondance virale en particules.ml^{-1}$

 $BA = abondance bactérienne en cellules.ml^{-1}$

Quand le CR croît, la probabilité de rencontre entre virus et bactéries augmente donc il y a probablement plus d'infections dues au caractère de parasite obligatoire.

2.11. <u>Principe de la microscopie électronique à transmission et mesure de la mortalité</u> <u>bactérienne imputable à la lyse virale</u>

Le laboratoire ne disposant pas de ce type d'outils, les analyses en microscopie électronique à transmission ont été effectuées par l'équipe «Structure et Dynamique des Macromolécules » de l'UMR 6026 CNRS-Université de Rennes 1.

La microscopie électronique à transmission, technique basée sur le principe de diffraction des électrons, permet d'atteindre des grossissements supérieurs à 500 000. Le premier microscope électronique à transmission a été mis au point en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska. Dans sa conception, un microscope électronique à transmission ressemble à un microscope classique, mais se trouve inversé. Il doit être couplé à un système de pompage afin de réaliser le vide dans la colonne du microscope, vide nécessaire pour permettre le déplacement des électrons et traverser l'échantillon pour en établir une image. Le flux d'électrons provient du chauffage d'un filament et de l'accélération des électrons libérés par le filament au moyen d'une différence de potentiel de 60 à 200 kilovolts. L'image d'un échantillon biologique est obtenue après contraste de l'échantillon au moyen de substances denses aux électrons qui se localisent préférentiellement au niveau des membranes biologiques (citrate de plomb) ou au niveau des acides nucléiques (acétate d'uranyle). De plus, l'échantillon biologique, pour être étudié au microscope électronique à transmission, doit être déshydraté et de faible épaisseur (< 100 nm).

Pour notre analyse en microscopie électronique à transmission, 15 ml provenant de 2 m et 50 m ont été fixés au glutaraldéhyde (1% final) puis conservé à 4°C au noir avant analyse. Les bactéries présentes dans les 15 ml d'échantillon ont été récoltées par ultracentrifugation à 116 000 g pendant 120 min à 4°C (Ultracentrifugeuse Beckman L8-55, rotor SW55) sur une grille de cuivre de microscope électronique (maille 400) recouverte d'un film de carbone (Sime-Ngando *et al.*, 1996). Chaque échantillon a été ensuite contrasté pendant 30 secondes avec de l'acétate d'uranyle (2% wt/wt) et examiné avec un microscope électronique à transmission Philips CM12 fonctionnant sous une tension de 100 kV et à un grandissement de 13 000. Une bactérie est considérée infectée lorsqu'il y a au minimum 3 bactériophages à l'intérieur et qu'ils sont clairement reconnaissables sur leurs critères de forme et de taille (figure 11). Afin d'estimer la mortalité bactérienne induite par les virus (VIBM Virus-induced bacterial mortality), la fréquence de cellules visiblement infectées (FVIC Frequency of visible infected cells, en

pourcentage) a tout d'abord été reliée à la fréquence de cellules réellement infectées (FIC Frequency of infected cells) grâce à la formule suivante :

$$FIC = 9,524FVIC - 3,256$$
 (Weinbauer, 2002)

La fréquence de cellules infectées a été ensuite convertie en mortalité bactérienne induite par les virus (VIBM) selon la formule de Binder (1999) :

$$VIBM = (FIC + 0, 6FIC^{2}) \div (1 - 1, 2FIC)$$

De plus, la microscopie électronique à transmission permet d'accéder au burst size des bactéries, c'est-à-dire la charge virale ou encore le nombre de virus libérés par cellule dans le milieu extracellulaire, un paramètre clef lorsque l'on s'intéresse à l'écologie virale.

2.12. <u>Induction du cycle lytique avec la mitomycine C, mesure de la fraction bactérienne</u> <u>lysogénique</u>

Pour chaque profondeur (2 et 50 m), 45 ml d'échantillon du lac ont été traités avec l'agent mutagène mitomycine C (Sigma) à deux concentrations finales : 1 et 0,5 μ g.ml⁻¹. Deux échantillons contrôles de 45 ml (2 et 50 m) ont également été suivis sans traitement à la mitomycine C dans le but de soustraire le nombre de virus présents dans les tests par ceux présents dans les contrôles à chaque temps d'analyse afin de voir ceux effectivement libérés suite à l'induction. Les échantillons ont été incubés à la température du lac et à l'obscurité pendant une durée totale de 24 heures entre les différents temps de prélèvement. A différents temps après traitement (T0, T3h, T6h, T12h et T24h), des triplicats de 2 ml de chaque échantillon (contrôles, MMC 0,5 μ g.ml⁻¹ et MMC 1 μ g.ml⁻¹) ont été fixés au glutaraldéhyde (1% final) pendant 15 minutes puis congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant analyse. La fraction de bactéries lysogéniques (frequency of lysogenic cells, FLC) soit le pourcentage de bactéries contenant des phages « tempérés » ou prophages susceptibles d'être induits en cycle lytique, a été déterminée en appliquant la formule suivante (Weinbauer et *al.* 2003, Williamson 2002) :

$$FLC(\%) = 100[(Vmc_{t24} - Vc_{t24}) \div (BS \times BAt0)]$$

Avec :

Vmc: abondance virale dans l'échantillon traité à la mitomicine C à 24h

Vc : abondance virale dans l'échantillon contrôle à 24h

BA : abondance des bactéries à t0

Bz= Burst size à t0

NB : Si le FLC est nul, tous les phages sont virulents (Lytiques)

2.13. Calcul du carbone libéré par la lyse

Le carbone libéré suite à la lyse virale a été calculé grâce à la formule de Wilhelm et Suttle (2000).

$$C_{libéré} = (PV \div Bz) \times C_{bacterie} \times 1000 \times 24 \times 10^{-9}$$

Avec :

 $C_{lib\acute{e}r\acute{e}}$: le carbone libéré suite à la lyse en $\mu g.l^{-1}.j^{-1}$

PV : la Production virale.ml⁻¹.h⁻¹

Bz : la charge virale par bactérie (27 selon Jacquet et *al.*, 2005, 2007, Sime-Ngando et *al.*, 2008) C_{bactérie} : la quantité de carbone par bactérie (23,3 fg)

2.14. Analyses statistiques

Afin de rendre compte des différences temporelles (*i.e* mois de prélèvement), nous avons utilisé le test non paramétrique de Kruskal-Wallis au seuil α de 5%.

3. RESULTATS

3.1. Contexte environnemental des communautés microbiennes

Les différentes caractéristiques physico-chimiques et de chlorophylle *a* ont permis d'avoir une idée générale sur les conditions initiales (T0) avant chaque expérience.

3.1.1. Evolution de la température

Entre les mois de janvier et avril la température oscillait entre $5,5^{\circ}$ C et $9,0^{\circ}$ C à 2 m et entre $5,5^{\circ}$ C à $8,1^{\circ}$ C à 50 m (figure 12). On observait logiquement une augmentation significative de la température entre les mois d'hiver et de printemps, surtout dans les eaux proches de la surface (p=0,008 à 2m et 50m).

3.1.2. Evolution de la concentration en oxygène dissous

Entre les mois de janvier et avril la concentration en oxygène dissous oscillait entre 10,0 et 13,7 mg.L⁻¹ à 2 m et entre 9,6 et 10,2 mg.L⁻¹ à 50 m (figure 13). On observait une augmentation de cette concentration entre les mois d'hiver et de printemps plus marquée à 2 m (p=0,008 à 2 m et p=0,016 à 50 m).

3.1.3. Evolution de la concentration en chlorophylle a

La concentration en chlorophylle *a* variait de 1,9 μ g.ml⁻¹ en janvier, à 15,6 μ g.ml⁻¹ en avril à 2 m et de 1,7 μ g.ml⁻¹ en avril à 3,46 μ g.ml⁻¹ en février à 50 m (figure 14). L'évolution des concentrations en chlorophylle *a* en fonction du temps était significative (p=0,002).

3.1.4. Evolution de la concentration des nutriments inorganiques et du COD

Les concentrations en nutriments inorganiques et COD sont résumées dans le Tableau 1. La concentration moyenne en nitrates sur la période d'étude était à 2 m de 0,47 mg.L⁻¹ ± 0,12 et de 0,55 mg.L⁻¹ ± 0,05 à 50 m. La concentration moyenne en silice à 2 m était de 2,36 mg.L⁻¹ ± 0,17. A 50 m, la valeur moyenne était de 2,55 mg.L⁻¹ ± 0,24. La concentration moyenne de phosphore total à 2 m et à 50 m était de 0,01 mg.L⁻¹ avec un écart-type nul (au centième près). La concentration moyenne en ammonium à 2 m et à 50 m était de 0,01 mg.L⁻¹ ± 0,02 à 2 m et ± 0,01 à 50 m. La concentration moyenne en azote total était de 0,65 mg.L⁻¹ ± 0,02 à 2 m et ± 0,01 à 50 m. La concentration moyenne en phosphate à 2 m était de 0,005 mg.L⁻¹ avec ± 0,001 et de 0,006 mg.L⁻¹ ± 0,002 à 50 m. La concentration moyenne en carbone organique dissous à 2 m était de 2,15 mg.L⁻¹ ± 0,06 et à 50 m la concentration moyenne était de 2,15 mg.L⁻¹

 \pm 0,06 à 2 et 50 m. Quelque soit le compartiment chimique considéré, les variations au cours du temps ne sont pas significatives (p<0,05) et ce, à chaque profondeur.

3.2. Evolution de la communauté bactérienne hétérotrophe

3.2.1. Evolution des abondances

La concentration des bactéries hétérotrophes variait entre 10^6 et 5.10^6 bactéries.ml⁻¹ à 2 m et entre 8.10^5 et 3.10^6 bactéries.ml⁻¹ à 50 m (figure 15). Au fur et à mesure de notre étude, la concentration augmentait et ce d'autant plus dans les eaux proches de la surface. Pendant la période d'étude, le pourcentage en bactéries LDNA variait entre 47% et 56% à 2 m et entre 45% et 54% à 50 m par rapport à l'abondance bactérienne totale. De janvier à mars, l'évolution de cette communauté était similaire à 2 m et 50 m. Parallèlement à l'augmentation de l'abondance de la communauté totale, le pourcentage de bactéries « High DNA », supposé être le groupe le plus actif (Zubbov et *al.*, 2006, Bouvier et *al.*, 2007), augmentait également de manière significative (p=0,008) (figure 16).

3.2.2. Evolution de la proportion des cellules actives

Deux colorants ont été utilisés pour estimer la proportion des cellules actives/inactives. Le protocole de coloration au CTC ayant été établit durant les mois de janvier et février, les premiers résultats n'ont été disponibles qu'en mars. La concentration optimale a été établie à 5 mM avec une incubation de 5 heures. La proportion de cellules ayant une activité respiratoire variait entre 0% et 34% respectivement en avril et mars à 2 et 50 m. Le 30 avril, 3% des cellules bactériennes étaient marquées au CTC à 2 m et 0% à 50 m. Les valeurs les plus élevées étaient enregistrées à 2 m pendant le mois de mars.

Avant le mois d'avril, aucun résultat n'a été obtenu pour le PI. Le 1er avril il y avait 24,6% de cellules dont la membrane était endommagée à 2 m. Le 17 avril, 32,7% à 2 m et 11, 9% à 50 m des cellules avaient leur membrane endommagée. Le 30 avril, ces pourcentages diminuaient avec 17% à 2 m et 8% à 50 m de cellules. (Figure 17)

3.2.3. Evolution de la production bactérienne carbonée

Parallèlement à l'augmentation des abondances bactériennes, la production bactérienne augmentait significativement en fonction du temps (p<0,001 à 2 et 50 m). La production bactérienne était globalement plus faible en profondeur, à l'exception notable du 13 mars où un pic d'activité était enregistré à 50 m. (Figure 18).

La demande en carbone était maximale fin avril aux deux profondeurs (175 μ gC.l⁻¹.j⁻¹ à 2 m et 111 μ gC.l⁻¹.j⁻¹ à 50 m), et était minimale en janvier aux deux profondeurs (2,4 μ gC.l⁻¹.j⁻¹ à 2 m et 4,1 μ gC.l⁻¹.j⁻¹ à 50 m).

3.2.4. Modification de la structure de la communauté bactérienne

L'analyse PCR-DGGE a révélé un maximum de 19 bandes à 2 et 50 m pendant la période d'étude. A partir de février, une bande apparaissait à 2 m (H'=0,21) qui était retrouvée à partir du 1^{er} avril à 50 m (H'=0). Deux bandes apparaissaient à partir du 1^{er} avril à 2 m (H'=0,07). Une de ces deux bandes étaient retrouvées à 50 m à partir du 1^{er} avril. Par ailleurs, à 2 m il y avait une bande présente durant tout la saison qui n'apparaissait qu'à partir du mois d'avril à 50 m. Il y avait une diversité spatio-temporelle plus marquée en surface. (Figure 19).

3.3. Evolution de la communauté virale

3.3.1. Evolution des abondances

Les abondances virales à 50 m diminuaient en fonction du temps, en revanche, à 2 m ces abondances fluctuaient davantage et réaugmentaient après le mois de mars, (p=0,008 à 2 m et 50 m). (Figure 20).

Les abondances virales suivaient les abondances des hôtes cependant la corrélation entre ces deux paramètres n'était pas significative (p>0.05, corrélation de Spearman).

3.3.2. Mesure de la production virale

La production de nouvelles particules virales augmentait en fonction du temps de façon significative à 2 m (p=0,029). Elle variait de $3,4.10^5$ particules.ml⁻¹.h⁻¹ (en mars) à 2.10^6 particules.ml⁻¹.h⁻¹ (en avril). Cependant l'augmentation de la production à 50 m n'était pas significative (p=0,151). Elle variait de $3,2.10^5$ particules.ml⁻¹.h⁻¹ (en mars) à 1.10^7 particules.ml⁻¹.h⁻¹ (en avril), cette dernière valeur étant toutefois artéfactuelle (Figure 21).

Le turnover viral diminuait significativement en fonction du temps (p=0,008 à 2 et 50 m). A 2 m il était de 1,4 jours fin avril et de 4,6 jours en mars (valeurs minimales et maximales). A 50 m, le turnover viral était minimal en avril (0,2 jours), et était maximal en janvier (5,8 jours). Les virus semblent donc se renouveler plus rapidement vers le printemps, lorsqu'il y a plus d'hôtes bactériens.

3.3.3. Mesure du taux de déclin

Deux concentrations finales de KCN ont été utilisées, 1 et 2 mM. La mesure du déclin à 2 mM n'a donné aucun résultat et nous n'avons illustré que l'évolution du déclin à la concentration de 1 mM. Le déclin mesuré par la méthode de Noble et Furhman a révélé des valeurs plus importantes en février. En effet, le déclin à 2 m était de 1,92 j⁻¹, et de 0,43 j⁻¹ à 50 m (figure 23). En revanche d'après la méthode de Heldal et Bratbak, les valeurs de déclin les plus fortes étaient enregistrées à la fin du mois d'avril à la profondeur de 2 m (0,10 j⁻¹) et en janvier à 50 m (0,08 j⁻¹) bien qu'à la fin du mois de mars le déclin soit presque aussi élevé (0,06 j⁻¹). (Figure 22)

3.4. Impact fonctionnel des virus bactériophages

3.4.1. Le ratio virus/bactéries (VBR)

Le VBR, utilisé comme un indicateur des relations entre virus et bactéries (Bratbak et Heldal, 1995), oscillait entre 10 et 53 à 2 m et entre 23 et 69 à 50 m (figure 24) avec une tendance nette à la diminution au cours du temps. Les valeurs les plus élevées étaient enregistrées en janvier, aux deux profondeurs (p<0,001 à 2 et 50 m), en lien avec une faible concentration bactérienne.

3.4.2. Le taux de contact entre les particules (CR)

Le CR, un estimateur des infections à succès, variait entre $6,3.10^7$ et $3,4.10^8$ à 2 m et entre $5,4.10^7$ et $2,5.10^8$ à 50 m. Les valeurs les plus basses au fur et à mesure de cette étude étaient enregistrées en janvier en lien avec une faible concentration des hôtes. (Figure 25). Le CR augmentait significativement aux deux profondeurs (p=0,008 à 2 et 50 m).

3.4.3. Fréquence de cellules bactériennes infectées (FIC), charge virale et VIBM

La MET nous a permis d'observer directement les bactéries et les virus et l'évolution des taux d'infection. Ainsi le FIC varie entre 0 et 40% à 2 m respectivement en février et avril. A 50 m le FIC variait entre 15,2 et 40% en février et avril respectivement. La mortalité bactérienne imputable à la lyse virale (VIBM) variait donc de 20,3 à 95,6% à 50 m et de 0 à 95,6% à 2 m. Elle était la plus importante en avril. La charge virale variait entre 4 en février et 7 en avril, et était nulle à 2 m en février.

3.4.4. Fréquence de bactéries lysogènes (FLC)

La fraction de bactéries lysogéniques variait entre 0 et 60% avec des valeurs plus élevées en hiver aux deux profondeurs. A la fin de l'hiver, cette proportion diminuait et les valeurs les plus élevées étaient observées à 50 m (Figures 26 et 27). A 2 m, il y avait une corrélation négative

significative (test de Spearman au seuil d'erreur 5%) entre la fraction lysogénique et la production bactérienne. Comparativement, aucune relation de ce type n'a été trouvé à 50 m (figure 28).

3.4.5. Carbone libéré par la lyse virale

L'augmentation du carbone libéré par la lyse virale au cours du temps était significative aux deux profondeurs (p<0,001 à 2 et 50 m). Si le pic incertain à 50 m le 1^{er} avril est enlevé, l'augmentation de carbone reste significative (p=0,016). (Figure 29). Comme nous avons pu le voir plus haut, une partie de ce carbone pouvait faire partie de la demande carbonée des bactéries.

4. DISCUSSION

Avec en moyenne 6.10^7 virus.ml⁻¹ et 3.10^6 bactéries.ml⁻¹ dans les eaux de surface du lac du Bourget, nos résultats ont montré que les abondances virales étaient toujours supérieures aux abondances bactériennes (d'un facteur 10 à 20 environ), qu'elles étaient toutes deux plus élevées en surface et qu'elles se suivaient (plus il y a d'hôtes, plus il y a de virus) en accord avec la littérature (Thingstad 2000, Suttle 2007, Weinbauer 2004). Début avril, l'observation d'un bloom de Cryptophycées en surface (F Rimet communication personnelle) semblait pouvoir expliquer l'augmentation des abondances bactériennes enregistrée à ce moment là et de surcroît celle des virus. Nos résultats montrent bien que la dynamique des bactériophages était fortement liée à celle des hôtes procaryotiques même si une faible corrélation était trouvée entre virus et bactéries, probablement en raison de la stratégie d'échantillonnage ne permettant pas d'accéder aux dynamiques à court-terme (Lymer et al. 2008). L'augmentation des abondances bactériennes et virales en février restait plus floue étant donné que les conditions de développement (température, nutriments et oxygène) ne semblaient pas pouvoir expliquer un tel phénomène. Une hypothèse serait qu'il y ait eu une succession de populations ne réagissant pas de la même façon, comme suggéré par l'augmentation du pourcentage de bactéries HDNA à ce moment là.

Si l'évolution de l'abondance est un bon indicateur de la dynamique des communautés, elle ne rend toutefois pas compte de l'activité réelle des cellules (Jardillier et *al.* 2005). Ainsi, les mesures de productions virale et bactérienne, du déclin viral, de l'activité et de la diversité bactériennes nous ont permis d'aller plus loin dans la compréhension du fonctionnement des communautés microbiennes. Ainsi, la mesure de la production bactérienne a révélé une augmentation significative au fur et à mesure du temps, avec un pic en mars à 50 m. Parallèlement à cela, la mesure de la production virale a montré qu'il y avait une légère augmentation en surface en fonction du temps. Cependant cette augmentation était écrasée par le pic observé en avril à 50 m. Toutefois, cette brusque augmentation semblait démesurée comparativement aux abondances virales à cette même profondeur pour cette même date qui n'étaient que de $4,7.10^7$ particules par millilitre. Si l'on s'en tient à l'hypothèse que la production virale doit équilibrée le déclin (Wilhelm et *al.* 2002), on aurait du obtenir une valeur proche de 7.10^5 particules par millilitre et par heure, soit deux ordres de grandeur inférieurs à celui trouvé. Cette forte valeur de production n'était donc probablement pas réelle et nous supposons qu'une erreur de manipulation ait pu survenir lors du conditionnement de l'échantillon (filtration, dilution).

La dynamique du compartiment viral a aussi été observée via la mesure du déclin. Les deux méthodes utilisées pour mesurer ce déclin ne donnaient pas les mêmes résultats. En effet, la technique utilisant le cyanure de potassium (Heldal et Bratbak 1991) donnait des valeurs dix fois plus faibles que celles obtenues par la méthode de filtration (Noble et Fuhrman 1997), ces dernières se rapprochant beaucoup plus de celles rapportées dans la littérature (Mathias et *al.* 1995, Suttle 1999). Nous pensons qu'elles étaient plus réalistes, et corroborant cette spéculation, Mathias et *al.* (1995) ont affirmé que le cyanure n'avait pas d'effet à une concentration de 2 mM, tout comme nous l'avons en effet constaté dans nos expériences, même si la raison de cela reste floue. A 1 mM, même si les valeurs de déclin restaient faibles, nous avons constaté une augmentation significative du déclin après le mois de février, en lien avec l'augmentation du rayonnement solaire et de la température ayant pu favoriser la dégradation des particules virales, à savoir les protéines de la capside et/ou l'ADN viral (Bongiorni et *al.* 2005, Cottrell et Suttle 1995).

Pour l'étude du compartiment bactérien, nous ne nous sommes pas contentés d'analyser les abondances et la production bactériennes et un effort a été consenti pour estimer la proportion de cellules actives afin de rendre compte du pourcentage de bactéries réellement productives et donc susceptibles d'être infectées. D'après la littérature, on aurait pu s'attendre à une augmentation des proportions de cellules actives en fonction des mois, en lien avec l'augmentation de la température vers le printemps accélérant le métabolisme cellulaire (del Giorgio *et al.* 1997). Parallèlement, on aurait pu s'attendre à une augmentation du nombre de cellules avec une membrane intacte en fonction des mois (Freese et *al.* 2006). Nos résultats n'ont pas confirmé cette hypothèse, mais nous n'avons travaillé que sur deux mois de prélèvement. L'analyse des prélèvements à venir (jusqu'au mois d'août) sera particulièrement intéressante afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus dans la littérature. A noter toutefois que la proportion de cellules HDNA augmentait en effet en fonction du temps, ces cellules étant généralement rapportés comme étant les plus actives (Bouvier et del Giorgio 2008).

La diversité génétique de la communauté bactérienne a également été analysée. La technique de PCR-DGGE nous a permis de constater: 1) la présence de changements au cours des saisons avec des génotypes (*i.e* nombre de bandes) apparaissant au fur et à mesure de l'étude ; 2) une légère différence entre la composition bactérienne de surface et celle de la couche profonde ; 3) une variabilité plus forte au sein de l'épilimnion. Ces résultats concordaient avec ceux de Pernthaler et al. (1998) ayant mis en évidence que la composition de la communauté d'eubactéries (dans le lac Gossenköllesee, Autriche) était majoritairement influencée par la fonte de la couche de glace, probablement associée à l'introduction de bactéries allochtones, au brassage thermique des eaux et par l'augmentation du rayonnement lumineux. Aussi, Pinhassi et Hagström (2000) ont suggéré que cette succession d'espèces bactérioplanctoniques soit le résultat de la variation de divers facteurs, notamment de la température, des concentrations en phosphate et en chlorophylle a, favorisant à différents moments de l'année l'établissement de différents phyla bactériens. De façon similaire, Schauer et al. (2003) ont montré que ce sont les variations de la MOD produite par les successions algales qui sont à l'origine, avec la température, de la structuration de la communauté bactérioplanctonique. Enfin, ces résultats sont aussi à mettre en lien avec la théorie du «killing the winner» où la lyse virale (voir plus bas) aurait pu augmenter la diversité bactérienne au travers de l'élimination des espèces les plus compétitrices (Weinbauer et Höfle 1998, Weinbauer et Rassoulzadegan 2004).

L'impact des bactériophages sur la communauté bactérienne est une donnée particulièrement importante dès lors que l'on s'intéresse au rôle fonctionnel de ces particules. Ainsi avonsnous mesuré le pourcentage de bactéries lysées par l'action virale. Celle-ci était en moyenne de 58% à 50 m et 48% à 2 m, en accord avec les valeurs hautes trouvées dans la littérature (Wommack & Colwell 2000, Jacquet et *al.* 2005). Suivant la valeur considérée pour la charge virale, le VIBM variait en fait entre et 0 et 95,6% à 2 m et entre 20,3 et 95,6% à 50 m confirmant l'importance de ce paramètre et la variabilité spatio-temporelle de la mortalité procaryotique imputable aux virus. Les pourcentages de bactéries lysées étaient supérieurs à 50 m en accord avec les résultats obtenus dans d'autres lacs (Weinbauer et Höfle 1998, Colombet et *al.* 2006). Une explication ici était que la mortalité bactérienne en surface est majoritairement due au broutage par les flagellés tandis qu'en profondeur la lyse virale pourrait prédominer. Nous n'avons pas mesuré l'abondance des protistes flagellés et ciliés ni l'activité de broutage de ces organismes si bien que cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée. Jusqu'à récemment il semblait avéré que le rôle des virus sur la mortalité bactérienne soit d'autant plus fort lorsque le broutage par les flagellés est faible (Weinbauer et Peduzzi 1995). Toutefois, de nombreux résultats ont laissé entrevoir des relations plus complexes entre virus, bactéries et protistes prédateurs (Miki et Jacquet 2008), notamment le fait que la lyse virale puisse être augmentée en présence des prédateurs zooplanctoniques (Simek et al. 2001, 2007, Weinbauer et al. 2003, 2007, Jacquet et al. 2007, Sime-Ngando et Pradeep-Ram 2005). Au cours de temps, de l'hiver au printemps, nous avons observé l'augmentation du VIBM suggérant, avec la venue de conditions favorables à la croissance bactérienne la prédominance du cycle lytique au détriment du cycle lysogène. La diminution de la fréquence de cellules lysogéniques correspondant à la proportion de bactéries infectées par des prophages (i.e intégrés au génome de leur hôte) a corroboré cette hypothèse. Selon plusieurs auteurs (Weinbauer et Suttle 1999, Paul 2008), plus il y a d'hôtes moins il y a de virus lysogéniques, plus l'activité bactérienne est favorisée mois il y a de virus lysogéniques. Il a donc été proposé que la lysogénie puisse constituer une sorte de refuge pour les phages lorsque les hôtes sont dans des conditions défavorables. Paul (2008) a d'ailleurs montré que les prophages répriment leurs propres gènes lytiques mais aussi ceux impliqués dans certains processus du métabolisme de l'hôte afin d'économiser l'hôte et le parasite et favoriser leur survie dans l'attente de jours meilleurs. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse puisque le pourcentage de cellules lysogéniques était corrélé négativement à la production bactérienne en surface, qui augmentait au fur et à mesure de conditions environnementales plus favorables à la croissance et à l'activité bactériennes. A 50 m, cette relation était également moins nette, là où la température ne variait pas et restait froide. Nous pensons donc que la proportion relativement élevée de bactéries lysogènes (jusqu'à 60% en hiver) suggère que les phages du lac du Bourget utilisent fortement cette stratégie lorsque les conditions de croissance (surtout la température) des hôtes sont peu favorables.

Pour finir, nous avons tenté d'estimer l'impact de la lyse sur la redistribution des éléments nutritifs. Logiquement, la quantité de carbone libéré suite à la lyse augmentait en fonction du temps en lien avec l'augmentation de l'activité lytique. Les concentrations de ce carbone libéré et son caractère potentiellement biodisponible (Middelboe *et al.* 2006) suggèrent qu'il pourrait alimenter le pool de la matière organique dissoute, rendue à nouveau disponible au bactérioplancton (Mun 2005, Suttle et *al.* 1990, Fuhrman 1992, Riemann et Middelboe 2002). Nos résultats ne permettaient toutefois pas de statuer sur ce dernier fait et des expériences complémentaires seraient nécessaires.

A court terme, les perspectives de recherche qui ressortent de notre étude sont :

- de continuer ces expériences en période estivale, afin de cibler une période d'activité biologique plus élevée pour les différentes communautés microbiennes et où les ressources nutritives sont limitées dans les eaux de surface ;
- relier les paramètres de viabilité bactérienne aux autres paramètres pour ne tenir compte dans nos analyses que des bactéries dites « viables » ou « actives » en terme de respiration ;
- 3) mettre en relation le FIC avec la production bactérienne lorsqu'il y aura plus de données de microscopie. Selon Bettarel et *al.* (2004) et Lymer *et al.* (2008), on peut s'attendre à ce qu'il y ait une corrélation positive entre ces deux paramètres, validant le fait que plus il y a d'hôtes plus il y aura d'infections à succès. Lorsque plus de données sur la mesure du VIBM seront disponibles, il s'agira aussi de comparer le CR avec la mortalité bactérienne pour expliquer le pourcentage de contacts qui amènent à une infection (Fisher 2002).

A plus long terme, les perspectives d'étude qui permettraient d'affiner notre réflexion sont :

- un suivi annuel plus fin (resserré dans le temps et dans l'espace) des communautés en terme d'abondances, d'activité et de diversité ;
- la réalisation d'expériences permettant de s'intéresser à l'utilisation du lysat bactérien pour la croissance du bactérioplancton ainsi que des modifications de structure des communautés ;
- de mieux comprendre l'influence de l'environnement sur le passage entre cycle lytique et cycle lysogénique et si une relation pourrait être établie avec les modifications de la structure de la communauté bactérienne ;
- une comparaison entre le lac du Bourget (mésotrophe) et par exemple le lac d'Annecy (oligotrophe) caractérisés donc par des états trophiques différents.



Figure 1: Schéma de la boucle microbienne (en bleu) et du court-circuit viral (en rouge) dans la chaîne trophique microbienne aquatique. La lyse virale des différents compartiments microbiens (phytoplancton et bactéries hétérotrophes) libère dans le milieu des virus ainsi que des débris cellulaires constituant des produits (protéines, acides nucléiques et autres composants cellulaires) riches en éléments azotés, phosphorés ou carbonés, potentiellement utilisables par les bactéries et le phytoplancton (Gobler et *al.*, 1997, Noble et *al.*, 1999). L'activité virale transforme donc le carbone particulaire en carbone dissous, court-circuitant ainsi le flux de carbone et de nutriments vers les consommateurs supérieurs.



Figure 2 : Chronologie des événements majeurs ayant marqué l'histoire de l'écologie virale aquatique.



Figure 3 : Les différents cycles possibles d'un bactériophage. D'après Weinbauer (2004)



Figure 4 : Carte bathymétrique simplifiée représentant le lac du Bourget et la station de prélèvement (point B). Source : <u>http://www.ipgp.jussieu.fr/rech/lge/dylachem/missions/CRO_DY1.pdf</u>



Figure 5: Schéma simplifié du déroulement global des expériences. 5L provenant des profondeurs 2 et 50 m permettent de réaliser les différentes expériences et analyses : la microscopie électronique à transmission, l'expérience d'induction des cellules lysogènes avec 2 concentrations en mitomycine C (MMC), la mesure du déclin viral selon deux méthodes (filtration et élimination des hôtes et inhibition de la production virale à l'aide de 2 concentrations en cyanure de potassium KCN), la production virale grâce à la dilution des hôtes bactériens, la production bactérienne grâce à l'incorporation de [³H] Leucine et la mesure de la viabilité bactérienne. Par ailleurs, les filtres 0,2 µm contenant les « concentras » bactériens sont utilisés pour l'expérience de PCR-DGGE.



Figure 6: Signatures typiques obtenues en cytométrie en flux (fluorescence verte FL1 du complexe ADN marqueur [SYBR Green I] en ordonnées *vs.* le Side Scatter en abscisses) d'un échantillon naturel du lac du Bourget permettant d'observer (A) la communauté virale et ses différents groupes (notamment les VLP1 correspondant aux bactériophages) et (B) les bactéries hétérotrophes et les différents groupes nommés « Low-DNA (LDNA) et High-DNA content bacteria (HDNA) ».



Figure 7 : Ensemble de cytogrammes permettant de discriminer les bactéries altérées et viables pour un échantillon du lac du Bourget après coloration avec le CTC (A) ou le PI (B).



Figure 8 : Schéma du principe de la DGGE. D'après <u>http://tresoria.over-blog.com/article-5384158.html</u>



Figure 9 : Schéma théorique pour la mesure de la production virale en nombre de virus produits par ml et par heure. La production de nouveaux virus correspond à la valeur de la pente de la droite de régression des abondances virales.ml⁻¹ en fonction du temps (sur 24h par exemple).



Figure 10 : Schéma théorique pour la mesure du déclin viral en nombre de virus perdus par heure. Le déclin viral correspond à la valeur de la pente de la droite de régression du logarithme des abondances virales en fonction du temps (sur 24h par exemple).



Figure 11 : Exemple d'images obtenues en MET révélant un bactériophage (A) et une bactérie infectée par quatre phages (B).



Figure 12 : Evolution de la température (en °C) en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 13 : Evolution de la concentration en oxygène dissous (en mg.L⁻¹) en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 14 : Evolution de la concentration en chlorophylle *a* (en μ g.ml-1) en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.

Tableau 1: Evolution des concentrations (mg.L⁻¹) en nitrates, silice, phosphore total, ammonium, azote total, phosphate et en carbone organique dissous, en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m. ND : Non Déterminé (problème avec l'appareil de mesure).

		17-janv	7-fev	13-mars	1-avr.	16-avr.
N-NO ₃	2 m	0,53	0,55	0,53	0,52	0,24
	50 m	0,53	0,55	0,55	0,63	0,47
SiO ₂	2 m	2,40	2,36	2,65	2,20	2,18
	50 m	2,42	2,31	2,99	2,56	2,45
Ptot	2 m	0,012	0,014	0,017	0,004	0,006
	50 m	0,012	0,014	0,016	0,005	0,007
N-NH4	2 m	0	0,002	0,003	0,007	0,045
	50 m	0,001	0,002	0,004	0,017	0,003
Ntot	2 m	0,64	0,68	0,74	0,79	0,42
	50 m	0,65	0,69	0,72	0,82	0,55
P-PO₄	2 m	0,004	0,005	0,004	0,004	0,006
	50 m	0,005	0,005	0,009	0,005	0,007
COD	2 m	2,11	2,11	2,23	ND	ND
	50 m	2,09	2,14	2,24	ND	ND



Figure 15 : Evolution des abondances de la communauté bactérienne totale (cell.ml⁻¹) en fonction des dates de prélèvements à 2 et 50 m.



Figure 16 : Evolution de la proportion de bactéries « High DNA » (en pourcentage par rapport aux bactéries totales) en fonction des dates de prélèvements à 2 et 50 m.



Figure 17: Evolution du pourcentage de bactéries actives (A) après marquage an CTC à 2 et 50 m. Evolution du pourcentage de bactéries endommagées (B) après marquage au PI à 2 et 50 m.



Figure 18 : Evolution de la production bactérienne (en μ g de carbone.l⁻¹.j⁻¹) en fonction des dates de prélèvements à 2 et 50 m.



Figure 19 : Photo du gel issu de la DGGE. De gauche à droite, les mois de prélèvement analysés (J : janvier, F : février, M : mars, A : 1^{er} avril, 16 avril et 30 avril) à 2 et 50 m.



Figure 20 : Evolution des abondances virales (en nombre de particules par ml) en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 21 : Evolution de la production virale (particules.ml⁻¹.h⁻¹) en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 22: Evolution du déclin (en j⁻¹) d'après la méthode de Heldal et Bratbak à la concentration de 1mM de cyanide de potassium, en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 23 : Evolution du déclin (en j⁻¹) d'après la méthode de filtration de Noble et Fuhrman, en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 24 : Evolution du VBR en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 25 : Evolution du taux de contact entre les virus et les bactéries (ml⁻¹.h⁻¹) en fonction des dates de prélèvement à 2 et 50 m.



Figure 26 : Proportion de bactéries lysogéniques (en pourcentage) à 2 et 50 m avec une concentration en mytomicine C finale de $0.5 \ \mu g.ml^{-1}$.



Figure 27 : Proportion de bactéries lysogéniques (en pourcentage) à 2 et 50 m avec une concentration en mytomicine C finale de 1 μ g.ml⁻¹.



Figure 28 : Relation entre la fréquence de bactéries lysogéniques (en pourcentage) et la production bactérienne (en μ g de carbone.l⁻¹.j⁻¹).



Figure 29 : Evolution du carbone libéré suite à la lyse virale (en μ g.l⁻¹.j⁻¹) en fonction des dates de prélèvement et à 2 et 50 m.

BIBLIOGRAPHIE

- Amann, R.I., 1995. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNAtargeted nucleic acid probes. Mol. Microb. Ecol. Mannual 3, 1-15.
- 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.
- Barbesti, S., Citterio, S., Labra, M., Baroni, M.D., Neri, M.G., Sgorbati, S., 2000. Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. Cytometry 40, 214-218.
- Berdjeb, L., Domaizon, I., Jacquet, S., In press. Impact of viruses on bacterial diversity and nutrient dynamics in peri-alpine lakes. Applied and Environmental Microbiology.
- Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., M., Heldal, M., 1989. High abundances of viruses found in aquatic environments. Nature 340, 467-468.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Dolan, J., 2004. Viral activity in two contrasting lake ecosystems. Applied and Environmental Microbiology 70, 2941-2951.
- Binder, B., 1999. Reconsidering the relationship between virally induced bacterial mortality and frequency of infected cells. Aquatic Microbial Ecology 18, 207-215.
- Bongiorni, L., Magagnini, M., Armeni, M., Noble, R., Danovaro, R., 2005. Viral production, decay rates, and life strategies along a trophic gradient in the north adriatic sea. Applied and Environmental Microbiology 71, 6644-6650.
- Bouvier, T., Del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., 2007. A comparative study of the cytometric characteristics of high and low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. Uncorrected proof Environmental Microbiology.
- Bratbak, G., Heldal, M., Norland, S., Thingstad, T.F., 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. Applied and Environmental Microbiology 56, 1400-1405.
- Bratbak, G., Heldal, M., 1995. Viruses-the new players in the game; their ecological role and could they mediate genetic exchange by transduction? NATO ASI Series. I. Joint. Berlin Heidelberg, Spronger Verlag 38, 249-264.
- Brussard, C.P.D., 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. Applied and Environmental Microbiology 70, 1506-1514.
- Colombet, J., Sime-Ngando, T., Cauchie, H.M., Fonty, G., Hoffmann, L., Demeure, G., 2006. Depth-Related Gradients of Viral Activity in Lake Pavin. Applied and Environmental Microbiology 72, 4440-4445.
- Cottrell, M.T., Suttle, C.A., 1991. Wide-Spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan eukaryotic marine phytoplanckter, Micromonas pusilla. Marine ecology progress 78, 1-9.
- Cottrell, M.T., Suttle, C.A., 1995. Dynamics of a lytic virus infecting the photosynthetic marine picoflagellate Micromonas pusilla. Limnol. Oceanogr. 40, 730-739.
- Del Giorgio, P.A., Prairie, Y.T., Bird, D.F., 1997. Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in Lakes, enumerated using CTC reduction and flow cytometry. Microbial ecology 34, 144-154.
- Del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., 2006. Physiological structure and single-cell activity in marine bacterioplankton. In: Marine Microbial ecology, 2nd edition, Chapter 8.
- Duhamel, S., Jacquet S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. Journal of Microbiological Methods 64, 316-322.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting : novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological methods, 56, 297-314.
- Falcioni, T., Papa, S., Gasol, J.M., 2008. Evaluating the Flow-Cytometric Nucleic Acid Double-Staining Protocol in Realistic Situations of Planktonic Bacterial Death. Applied and Environmental Microbiology, 74, 1767-1779.
- Fisher, S.G., Lerman, L.S., 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with metlting theory. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 80, 1579-1583.

- Fisher, U.R., Velimirov, B., 2002. High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. Aquatic Microbial Ecology 27, 1-12.
- Freese, H.M, Karsten, U., Scumann, R., 2006. Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic river Warnow, northeast Germany. Microbial ecology 51, 117-127.
- Fuhrman, J.A., Azam, F., 1980. Bacterioplankton secondary production estimates of coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. Applied and Environmental Microbiology 39, 1085-1095.
- Fuhrman, J.A., 1992. Bacterioplancton 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., Suttle, C. A., 1993. Viruses in marine planktonic systems. Oceanography 6, 51-63.
- Fuhrman, J.A., Noble, R., 1995. Viruses and protests cause similar bacterial mortality in coastal sweater. Limnology and Oceanography 40, 1236-1242.
- Fuhrman, J. A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature 399, 541-548.
- Garza, D.R., Suttle, C.A., 1995. Large double-stranded DNA viruses which causes the lysis of a marine heterotrophic nanoflagellate (*Bodo sp.*) occur in natural marine communities. Aquat. Microb. Ecol. 9, 203-210.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., Field, K. G., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 345, 60-63.
- Gobler, C.J., Hutchins, D.A., Fisher, N.S., Cosper, E.M., Sanudo-Wilhelm, S., 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine chlorophyte. Limnology and Oceanography, 42.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial Ecol. 35, 1-21.
- Heldal, M., Bratbak, G., 1991. Production and decay of viruses in aquatic environments. Marine ecology progress series 72, 205-212.
- Hennes, K.P., Simon, M., 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. Appl. Environ. Microbiol. 61, 333-340.
- Jacquet, S., Briand, J.F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.C., Anneville, O., Humbert, J.F., 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). Harmful Algae 4, 651-672.
- Jacquet, S., Domaizon, I., Personnic S., Sriram, A., Ram, P., Hedal, M., Duhamel, S., Sime-Ngando, T., 2005. Estimates of protozoan- and viral-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). Freshwater Biology 50, 627-645.
- Jacquet, S., Personnic, S., 2007. Les virus chefs d'orchestre aquatiques. La Recherche 407, 50-53.
- Jacquet, S., Domaizon, I., Personnic, S., Sime-Ngando, T., 2008. Do small grazers influence virusinduced mortality of bacteria in lake Bourget (France)? Fundamental and Applied Limnology 170, 125-132.
- Jardiller, L., Bettarel, Y., Richardot, C., Amblard, C., Sime-Ngando, T., 2005. Effects of viruses and predators on procaryotic community composition. Microb. Ecol. 50, 557-569.
- Kirchman, D., K'nees, E., Hodson, R., 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. Appl. Environ. Microbiol. 49, 599-607.
- Larsen, A., Flaten, G. A. F., Sandaa, R. A., Castberg, T., Thyrhaug, R., Erga, S. R., Jacquet, S., Bratbak, G., 2004. Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. Limnology and Oceanography 49, 180-190.
- Lee, S., Fuhrman, J.A., 1987. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1298-1303.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiology Reviews 15, 155-173.
- Lymer, D., Lindström, E.S., Vrede, K., 2008. Varaible importance of viral induced bacterial mortality in lakes along gradients in trophic status and humic content. Freshwater biology 1-29.

- Marie, D., Vaulot, D., F., Partensky, 1996. Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokariotes. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1649-1655.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaulot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Appl. Environ. Microbiol. 63, 186-193.
- Marie, D., Brussard, C.P.D., Thyrhaug, R., Bratbak, G., D., Vaulot, 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 65, 45-52.
- Mathias, C. B., Kirchner, A. K. T., Velimirov, B., 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube river. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3734-3740.
- McManus, G.B., Fuhrman, J.A., 1988. Control of marine bacterioplankton populations: Measurement and significance of grazing. Hydrobiologia 159, 51-62.
- Middelboe, M., Jorgensen, N.O.G., 2006. Viral lysis of bacteria: an important source of dissolved amino acids and cell wall compounds. Journal of the marine biological association of the UK 86, 605-612.
- Middelboe, M., Jacquet, S., Weinbauer, M.G., 2008. Viruses in freshwater ecosystems : an introduction to the exploration of viruses in new aquatic habitats. Freshwater biology 53, 1069-1075.
- Miki, T., Jacquet, S., 2008. Complex interactions in the microbial world: under-explored key links between viruses, bacteria and protozoan grazers in aquatic environments. Aquat. Microb. Ecol. 51, 195-208.
- Monger, B.C., Landry, M.R., 1993. Flow cytometric analysis of marine bacteria using Hoeschst 33342. Appl. Environ. Microbiol. 59, 105-111
- Murray, A. G., Jackson, G. A., 1992. Viral dynamics: a model of the effect of size, shape, motion and abundance of single celled planktonic organisms and other particles. Marine Ecology Progress Series 89, 103-116.
- Muyzer, G., Wall, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695-700.
- Nagasaki, K., Ando, M., Itakura, S., Imai, I., Ishida, Y., 1994. Viral mortality in the final stages of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) red tide. Journal of Plankton Resarch 16, 1595-1599.
- Noble, R.T., Fuhrman, J.A., 1997. Virus decay and its causes in coastal waters. Appl. Environmental Microbiol. 63, 77-83.
- Noble, R.T., Middelboe, M., Fuhrman, J.A., 1999. Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. Aquatic Microbial Ecology 18, 1-13.
- Olson, R.J., Vaulot, D., Chisholm, S.W., 1985. Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. Deep-sea research 32, 1273-1280.
- Pace, M.L., 1988. Bacterial mortality and the fate of bacterial production. Hydrobiologia 9, 41-49.
- Padan, E., Shilo, M., 1973. Cyanophages-Viruses attacking blue green algae. Bacteriological Reviews, 343-370.
- Paul, J.H., Sullivan, M.B., 2005. Marine phage genomics: what have we learned? Current Opinion in Biotechnology 16, 299-307.
- Peduzzi, P., Weinbauer, M., 1993. The submicron size fraction of seawater containing high numbers of virus particles as bioactive agent in unicellular plankton community successions. Journal of plankton Research 15, 1375-1386.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R. et Amann, R.I., 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4299-4306.
- Pinhassi, J., Hagström, Å., 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. Aquat. Microb.Ecol. 21, 245-256.
- Proctor, L.M., Fuhrman, J.A., 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. Nature 343, 60-62.
- Riemann, L., Middelboe, M., 2002. Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. Aquatic microbial ecology 27, 219-232.

- Servais, P., Billen, G., Rego, J.V., 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1448-1454.
- Shapiro, H.M., 1988. Practical flow cytometry. Second edition. New York, Alan R. Liss.
- Schauer, M., Massana, R., Pedros-Alios, C., 2000. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalon coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. FEMS Microbiol. Ecol. 33, 51-69.
- Schauer, M., Balagué, V., Pedros-Alio, C., Massana, R., 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. Aquat.Microb. Ecol. 31, 163-174.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., Hopkinson, C.S., 1988. Trophic interactions within pelagic microbial communities: indications of feedback regulation of carbon flow. Hydrobiologia 159, 19-26.
- Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M.G., Hornak, K., Dolan, J.R., Nedoma, J., Masin, M., Amann, R., 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. Applied and environmental micriobiology 67, 2723-2733.
- Simek, K., Weinbauer, M.G., Hornak, K., Jezbera, J., Nedorna, J., Dolan, J.R., 2007. Grazer and virusinduced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. Environmental Microbiology 9, 789-800.
- Sime-Ngando, T., 1996. Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. Année Biologiques 36, 181-206.
- Sime-Ngando, T., Bettarel, Y., Chartogne, C., Sean, K., 2003. The imprint of wild viruses on fresh water microbial ecology. Recent Research Development in Micobiology 7, 481-497.
- Sime-Ngando, T., Colombet, J., Personnic, S., Dmaizon, I., Dorigo, U., Perney, P., Hustache, J.C., Viollier, E., Jacquet, S., 2008. Short-term variations in abundances and potential activities of viruses, bacteria and nanoprotists in lake Bourget. Ecological Research, original article.
- Spencer, R., 1955. A marine bacteriophage. Nature 175, 690-691.
- Suttle, C.A., Chan, A.M., Cottrell, M.T., 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. Nature 347, 467-469.
- Suttle, C.A., 1992. Inhibition of photosynthesis in phytoplankton by the submicron size fraction concentrated from seawater. Mar Ecol Prog Ser 87, 105-112.
- Suttle, C.A., Chan, A.M., 1993. Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of Synechococcus : Abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. Mar Ecol Prog Ser 92, 99-109.
- Suttle, C.A., 2000. Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. Kluwer Acadenic publishers, 563-589.
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses major players in the global ecosystem. Nature 5, 801-812.
- Thingstad, T.F., Lignell, R., 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. Aquatic Micobiology Ecology 13, 19-27.
- Thingstad, T.F., 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversityn and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. Limnology and oceanography 45, 1320-1328.
- Torrela, F., Morita, R. Y., 1979. Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophages particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. Applied and Environmental Microbiology 37, 774-778.
- Twort, F.W., 1915. An investigation of the nature of ultramicroscopic viruses. Lancet 2, 1241-1243.
- Van Hannen, E., Zwart, G., Van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Ebert, J., Laanbroek, H.J., 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. Appl. Environ. Microbiol. 65, 795.
- Vaulot, D., 1989. CytoPC : processing software for flow cytoometric data. Signal Noise 2, 8.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M., 1990. 16SrRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345, 63-65.
- Weinbauer, M.G., Peduzzi, P., 1995. Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for conrolling bacterial abundance in the northern Adriatic Sea. J. Plankton Res. 17, 1851-1856.
- Weinbauer, M.G., Suttle, C.A., 1996. Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the gulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4374-4380.

- Weinbauer, M.G., Höfle, M., 1998. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton in a eutrophic lake. Appl. Environ. Microbiol. 64, 431-438.
- Weinbauer, M.G., Suttle, C.A., 1999. Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. Aquatic Microbial Ecology 18, 217-225.
- Weinbauer, M.G., 2002. Reconsidering transmission electron microscopy based estimates of viral infection of bacterioplankton using conversion factors derived from natural communities. Aquatic microbial ecology 27, 103-110.
- Weinbauer, M.G., Brettar, I., Höfle, M., 2003. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters, Limnology oceanography 48, 1457-1465.
- Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic virus. Microbiology reviews 28, 127-181.
- Weinbauer, M.G., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? Environmental microbiology 6, 1-11.
- Weinbauer, M.G., Rassoulzadegan, F., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? Environmental Microbiology 6, 1-11.
- Weinbauer, M.G., Hornak, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Dolan, J.R., Simek, K., 2007. Synergistic and antagonistic effects of viral lysis and protistan on bacterial biomass, production and diversity. Environmental Microbiology 9, 777-788.
- Wilhelm, S.W., Weinbauer, M.G., Suttle, C.A., Jeffrey, W.H., 1998. The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea. Limnology and Oceanography 43, 586-592.
- Wilhelm, S.W., Suttle, C.A., 1999. Viruses and Nutrient Cycles in the Sea Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. Bioscience 49, 781-788.
- Wilhelm, S.W., Suttle, C.A., 2000. Viruses as regulators of nutrient cycles in aquatic environments. Microbial Biosystems: New Frontiers, 551-556.
- Wilhelm, S.W., Brigden, S.M., Suttle, C.A., 2002. A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. Microbial ecology 43, 168-173.
- Williamson, S.J., Houchin, L.A., McDaniel, L., Paul, J.H., 2002. Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4307-4314.
- Wommack, E.K., Colwell, R.R., 2000. Virioplankton. Viruses in aquatic ecosystems 64, 69-114.
- Zubbov, M.V., Tarran, G.A., Burkill, P.H., 2006. Bacterioplankton of low and high DNA content in the suboxic waters of the Arabian sea and the gulf of Oman: abundance and amino acid uptake. Aquatic microbial ecology 43, 23-32.

ANNEXES

ANNEXE 1 - Préparation du tampon 1X TE

- Tris base 0,3 g (10 mM)
- EDTA 0,093g (1 mM)
- Compléter à 250 ml avec de l'eau MilliQ
- Ajuster à pH=8 avec de la soude et de l'acide chlorhydrique (0,1 mM)
- Autoclaver le tampon
- Conserver à 4°C
- Lors de son utilisation, filtrer à travers 0,02 µm avec un filtre seringue

ANNEXE 2 - Préparation de cyanure de potassium (KCN) 20 mM

- $M_{ken}=65,12 \text{ g.mol}^{-1}$
- Peser 19,536 mg de KCN pur
- Compléter à 15 ml avec de l'eau MilliQ (filtrée sur 0,2 µm)
- Ajuster à pH=7
- Conserver à 4°C au noir
- Lors de son utilisation à 1 mM, prendre 2,25 ml de cette solution et la diluer dans 45 ml d'eau du lac. Lors de son utilisation à 2 mM, prendre 4,5 ml de cette solution et la diluer dans 45 ml d'eau du lac.

ANNEXE 3 - Préparation de la mitomycine C 5 mg.ml⁻¹

- 10 mg de mitomycine C
- Ajouter 2 ml d'eau MilliQ (filtrée sur 0,2 µm)
- Conserver à 4°C au noir
- Lors de son utilisation à $0,5 \ \mu g.ml^{-1}$, prendre $4,5\mu l$ de cette solution et la diluer dans 45 ml d'eau du lac. Lors de son utilisation à $1 \ \mu g.ml^{-1}$, prendre $9 \ \mu l$ de cette solution et la diluer dans 45 ml d'eau du lac.

ANNEXE 4 - Préparation du Iodure de Propidium 1 mg.ml⁻¹

- Peser 1 mg de iodure de propidium
- Ajouter 1 ml d'eau MilliQ (filtrée sur 0,2µm)
- Filtrer sur 0,2 µm
- Conserver à 4°C au noir
- Lors de son utilisation à 10 μg.ml⁻¹, prendre 2,5 μl de cette solution et la diluer dans 245 μl de tampon TE, 2,5 μl de Sybr green 1 et 5 μl d'eau du lac.

ANNEXE 5 - Préparation du 5-cyano-2,3-diotolyl tetrazolium chloride 50 mM

- Peser 16 mg de CTC
- Ajouter 1 ml d'eau MilliQ (filtrée sur 0,2µm)
- Filtrer sur 0,2µm
- Conserver à 4°C au noir
- Lors de son utilisation à 5 mM, prendre 100 μ l de cette solution et la diluer dans 1 ml d'eau du lac.

ANNEXE 6 - Préparation de la [³H] Leucine 80 nM

- Solution de départ à 1mCi.ml^{-1} , $M_{\text{Leu}} = 131\text{g.mol}^{-1}$
- Peser 131g de Leucine (1 mCi.ml⁻¹)
- Ajouter 11 d'eau MilliQ, ce qui fait une solution à 1M
- Activité spécifique de la leucine = 73000 mCi.ml⁻¹

- On veut l'utiliser à 80 nM final soit une dilution de 8.10^{-8}
- La molarité de ma solution de départ est de 1 mci.ml⁻¹ / 73000 mCi.mmol⁻¹ = 1,36986.10⁻⁵ M
- Pour aller à 80 nM soit 8.10^{-8} M, je dois diviser 171 fois la solution de départ. Si je raisonne avec 1 ml d'échantillon et que je veux une concentration finale à 80 nM, en utilisant 80 µl (dilution de 1/25 de la solution intermédiaire) pour un certain nombre d'échantillons, je fais par exemple 500 µl de solution intermédiaire à 10^{-6} , soit 1 ml de la sauce mère dans 12,7 ml d'eau.

ANNEXE 7 - Protocole de l'extraction et purification de l'ADN eubactérien pour la DGGE

I – EXTRACTION

- Ajouter 750µl de tampon de lyse dans chaque tube épendorf contenant le filtre, vérifier que le filtre est bien immergé dans le tampon. Placer les tubes dans le congélateur à -80°C pendant 15minutes.
- Les tubes sont ensuite passés aux ultra-sons pendant quelques secondes afin de décoller les cellules du filtre
- Centrifuger quelques secondes les échantillons dans une centrifugeuse de paillasse
- Ajouter dans chaque tube 47 µl de lysozyme et placer les tubes pendant 45 min dans l'armoire thermostatée sur l'agitateur réglé au minimum.
- Centrifuger les tubes quelques secondes pour éviter les contaminations à l'ouverture des tubes.
- Ajouter 75 µl de SDS 10% et 10µl de protéinase K
- Placer les tubes pendant 1h30 dans le bain-marie à 55°C
- Effectuer un speed-down

II - PURIFICATION : séparer l'ADN des composants cellulaires résultants de l'extraction

- Transférer les échantillons, sans leur filtre, dans un autre tube épendorf à l'aide d'une micropipette équipée d'un cône à filtre 1ml, noter le volume récupéré. *Ne pas oublier de numéroter les nouveaux tubes, garder à 4°C les anciens tubes contenant le filtre, ils peuvent être réutilisés si l'ADN extrait est peu abondant.*
- Ajouter dans chaque nouveau tube un volume égal de phénol chloroform-isoamyl alcool (travailler sous la hotte avec des gants en nitrile). Mélanger doucement avec la pipette.
- Centrifuger à 15000RPM pendant 10 minutes
- Récupérer la phase supérieure avec un cône à filtre et transférer dans un nouveau tube épendorf.
- Recommencer cette étape une nouvelle fois
- Ajouter un volume égal de chloroforme afin d'éliminer le phénol résiduel qui peut agir comme inhibiteur lors de l'amplification de l'ADN
- Centrifuger à 15000RPM pendant 10 minutes
- Récupérer la phase supérieure dans un nouveau tube

III - PRECIPITATION ET SOLUBILISATION DE L'ADN

- Ajouter de l'acétate de sodium : 10% du volume récupéré. L'acétate de sodium est un coprécipitant de l'ADN
- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol à 100% froid
- Entreposer les échantillons à -80°C pendant une nuit
- Démarrer le groupe froid du speed vac (pour lyophiliser l'ADN) et programmer la centrifugeuse 1/2heure avant de centrifuger
- Centrifuger les tubes 30 min à 15000RPM
- Prélever le surnageant et le transférer dans un deuxième tube épendorf (au cas où il resterait de l'ADN dans le surnageant)
- Laver le culot avec 300µl d'éthanol à 80% pour enlever les sels d'acétate de sodium qui pourraient inhiber les étapes d'amplification d'ADN
- Centrifuger les tubes pendant 10 min à 15000 RPM et jeter le surnageant
- Répéter l'étape de lavage
- Disposer les tubes ouverts dans le speed vac, laisser sécher le culot pendant une heure
- Selon l'importance du culot, ajouter de 30µl à 100µl de tampon TE
- Afin de solubiliser l'ADN, les tubes sont placés au bain-marie pendant 2h à 37°C puis stockés à -20°C

IV - DOSAGE DE LA QUANTITE D'ADN BACTERIEN PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Afin de connaître la concentration d'ADN extraite, et /ou d'avoir une concentration identique pour tous les échantillons lors des analyses, on peut doser l'ADN par la méthode de spectrophotométrie.

À 260 nm, une unité de densité optique correspond à 50 μ g.ml⁻¹ d'ADN (double brin).

- Faire le blanc avec de l'eau stérile en introduisant 80µl d'eau dans la cuve de spectrophotométrie et suivre les indications du fournisseur pour connaître la valeur de la DO. Enlever l'eau de la cuve
- Une dilution de l'échantillon est effectuée avec la même eau stérile au 1/80^{ème}: prélever 1µl d'ADN et ajouter 79µl d'eau, bien mélanger
- Lire les valeurs de DO

V - AMPLIFICATION PAR PCR

La PCR se déroule en trois étapes :

- la dénaturation de l'ADN par un choc thermique
- l'hybridation de l'ADN : le couple d'amorces va se fixer de manière spécifique à la matrice d'ADN simple brin grâce à un refroidissement pour atteindre la température optimale d'hybridation des amorces
- l'élongation ou polymérisation : la réaction est chauffée à la température à laquelle l'activité de la Taq polymérase est maximale et l'ADN double brin est reformé.
- Ces trois étapes sont répétées n fois, le fragment d'ADN est ainsi répliqué 2ⁿ fois.

Tableau A : Composition du mélange utilisé en PCR pour un échantillon et un volume réactionnel de $25\mu l$ ($1\mu l$ d'ADN)

Ingrédients	Volume (en µl)
Tampon 10X	2,5
dNTP	1,5
Amorce sens	1
Amorce antisens	1
BSA	1,25
Taq	0,25
Eau stérile	14,5
ADN	1

Tableau B : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité bactérienne. La queue GC (« GC clamp ») permet par la suite une stabilisation des fragments sous forme double brin.

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Référence bibliographique	
358F	GC clamp - CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer (1993)	
907RM	CCG TCA ATT C(AC)T TTG AGT TT	Schauer <i>et al.</i> (2003)	

- Bien homogénéiser
- Placer les tubes dans le thermocycleur (Thermal Cycler T-Personal, *Biometra*) et choisir le programme

Tableau C : Caractéristiques du programme utilisé pour l'analyse en DGGE de la diversité eubactérienne

	Boucle n°1	Boucle n°2	Boucle n°3	Boucle n°4
Nombre de cycles	1	10	20	1
Dénaturation	5min à 94°C	1min à 94°C	1min à 94°C	5min à 72°C
Hybridation		1min à 65°C (- 1°C/cycle)	1min à 55°C	
Elongation		3min à 72°C	3min à 72°C	

VI - ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE 1%

Grâce à l'utilisation d'un marqueur de taille approprié, l'électrophorèse en gel d'agarose permet de vérifier la qualité et la taille approximative de l'ADN amplifié. Le gel d'agarose contient du TBE 0,5X, de l'agarose en poudre et du Bromure d'éthidium (BET) permettant de visualiser l'ADN sous lumière UV.

- Peser 0,5g d'agarose
- Mesurer 50ml de tampon TBE 0,5X et mélanger à l'agarose
- Faire bouillir 45 secondes aux micro-ondes
- Refroidir
- Ajouter une goutte de BET au mélange TBE-agarose et mélanger
- Couler le gel dans le moule à électrophorèse
- Une fois le gel solidifié, mettre le gel dans son portoir dans la cuve à électrophorèse remplie avec du TBE 0,5X
- Mélanger une goutte de tampon de charge (GBL5X) et 4µl de produit de PCR et poser ce mélange dans un puits du gel.
- Déposer dans une rangée du gel, 4µl de marqueur de taille (*Invitrogen*)
- Faire migrer pendant 30minutes au minimum à 100volts
- Observer le gel sur la plaque UV (TEX-35M, *Bioblock Scientific*)

VII - DGGE

VII. a - Préparation du gel

- Des espaceurs pour le gel d'1mm sont enduits (sur les deux faces) avec de la vaseline sur le bord extérieur afin de créer une barrière plus étanche et d'isoler les côtés du gel du courant.
- Prendre des pinces et clipser les deux plaques ensemble en commençant par le bas à gauche et à droite, puis milieu, ensuite 1 pince côté bas à gauche et 1 côté gauche bas à droite, puis 2 pinces de chaque côté : au total 3 pinces en bas et 3 sur chaque côté
- Mettre les plaques en position verticale
- Le gel est coulé par gravité. Placer la chambre de mélange sur la plaque d'agitation
- Mettre un petit agitateur dans le compartiment 1 de la chambre d'agitation
- Adapter le robinet sur la chambre. Un tuyau sera mis à la sortie du robinet et aura un adaptateur à seringue à l'autre bout. Ajouter une aiguille de seringue qui puisse s'insérer entre les deux plaques à DGGE à l'adaptateur
- Positionner la seringue entre les deux plaques au milieu de celles-ci, la fixer avec une pince métallique et vérifier que le tuyau soit bien tendu



Figure A : Photo du système d'écoulement, 1-Compartiment 1, 2- compartiment 2 de la chambre de mélange, 3-Plaques montées

VII. b - Préparation des solutions de dénaturation

Couler un gel 6% de polyacrylamide (acrylamide / bis-acrylamide 37,5 : 1) avec un gradient linéaire d'agents de dénaturation (100% de solution de dénaturant correspondent à 7M d'urée et 40% de formamide). Nous avons utilisé un gradient de 40-80% afin d'évaluer la diversité bactérienne (Schauer *et al.* 2000).

Tableau D : Composition d'un gel de 1mm d'épaisseur et contenant un gradient de 40-80%. Le 0% servira à remplir le haut du gel.

Solutions	80% solution	0% solution	Temed	APS	GBL 5X
filles	mère	mère			
0		6ml	6µl	30µ1	
40	6ml	6ml	11µl	60µl	
80	6ml		11µl	60µl	80µ1

- Disposer trois flacons vides marqués 0, 40, 80% dans la glace
- Disposer dans le bac également les solutions mères à 0 et 80%, le TEMED et un aliquot d'APS
- Distribuer le 0% mère puis le 80%
- Ajouter le TEMED
- Ajouter l'APS sans les solutions 40% et 80%
- Homogénéiser

VII. c - Mise en place du gel de DGGE

- Ajouter la solution la plus concentrée dans le compartiment 1 près de la sortie
- Ajouter la solution la moins concentrée dans le compartiment 2
- Ouvrir l'interconnexion entre les deux chambres
- Faire une sous-pression sur le compartiment 2 afin que la solution le plus concentrée puisse passer à gauche une fois la sous-pression enlevée
- Mettre en route l'agitation
- Ouvrir le robinet de sortie et mettre le chronomètre en route
- Quand tout le liquide s'est écoulé, arrêter l'agitation et le chronomètre
- Ajouter l'APS dans la solution fille 0%
- Ajouter la solution fille 0% dans le compartiment de sortie
- Faire écouler la solution 0%, laisser déborder légèrement du gel, fermer le robinet, sortir l'aiguille
- Ajouter le peigne 16 puits
- La polymérisation se fait en 3heures
- Allumer le bain-marie réglé à 60°C. S'assurer que le bac contient 20L, sinon ajouter de l'eau bi-permutée afin de compléter le niveau.

VII. d - Préparation de la migration

- Retirer la partie inférieure du joint et toute les pinces
- Fixer le gel sur son support avec 4 grandes pinces
- Placer l'ensemble dans la cuve
- Brancher un tuyau d'arrivée de tampon du bac sur l'arrière du portoir (le plus bas)
- Laisser le tampon remplir la partie contenant le peigne
- Retirer doucement le peigne et corriger éventuellement les parois des puits à l'aide d'un cône fin
- Réduire le flux du bac avec son régulateur afin d'éviter une arrivée du tampon trop brutale qui provoquerait des contaminations inter-puits. Faire néanmoins très attention que le tampon soit toujours au dessus des puits.

VII. e - Réalisation des dépôts

- Mélanger du GBL 5X (5-7µl) avec le produit PCR. Charger ce mélange à l'intérieur d'un puit
- Brancher l'électrode (noire) sur le haut du portoir et laisser à 100V
- La migration dure 16h (Schauer *et al.*, 2000)

VII. f - Arrêt de la migration et révélation

- Enlever le tuyau d'arrivée du tampon et débrancher la cathode
- Récupérer la plaque qui contient le gel
- Faire une encoche au niveau du dernier puit afin de repérer l'ordre de chargement des échantillons
- Préparer la solution de coloration dans un tube qui contiendra 20ml de TAE 1X et 3 à 4,5µl de SYBRGold (1 : 5000 concentration finale)
- Répandre cette solution au dessus du gel de façon homogène
- Laisser agir 45min

- Placer la plaque contenant le gel dans un bac contenant une plaque colorée (pour mieux voir le gel) et contenant suffisamment d'eau ultrapure
- Avec un morceau de sopalin qui est posé sur le gel, le gel est récupéré et déposé sur une plaque en plexiglass transparente aux rayons UV (TEX-35, Bioblock Scientific)
- Enlever le sopalin et les bulles d'air au dessous du gel avec de l'eau ultrapure
- Exposer quelques secondes le gel aux rayons UV (à 70%) afin de voir les profils

Résumé

Etude de la dynamique et de l'importance fonctionnelle des virus bactériophages du lac du Bourget

Nous avons analysé la dynamique de la communauté virale et l'impact des bactériophages en tant qu'agents de mortalité des organismes procaryotiques ainsi que leur rôle potentiel dans la redistribution des ressources nutritives. Dans ce but, diverses expériences ont été menées, entre les mois de janvier et mai 2008, sur des échantillons provenant de deux profondeurs du lac du Bourget (le plus grand lac naturel français), l'épilimnion (2 m) et l'hypolimnion (50 m). La concentration virale variait entre 4.10^7 et 8.10^7 part.ml⁻¹. La production virale variait entre $3.4.10^5$ part.ml⁻¹.h⁻¹ (en mars) et 2.10⁶ part.ml⁻¹.h⁻¹ (en avril) à 2 m et elle était légèrement plus élevée à 50 m. Les valeurs maximales de déclin étaient enregistrées en surface, à l'exception du mois de janvier, et les taux de perte atteignaient en février 1,9 j⁻¹ à 2 m et 0,2 j⁻¹ à 50 m. Les virus pouvaient être responsables de 20 à 100% de la mortalité bactérienne journalière mais ces valeurs mériteraient d'être affinées au regard du faible nombre de bactéries observé en microscopie électronique. Il semblait néanmoins qu'une forte variation de ce paramètre est observée entre l'hiver et l'été, entre 2 et 50 m. Cette variabilité pourrait être reliée aux modifications de la structure (appréhendée par PCR-DGGE), de la production et/ou de l'activité bactérienne observée au cours du temps, surtout à 2 m en lien avec les modifications observées dans les principales variables environnementales (température, lumière, nutriments, chlorophylle a). La production bactérienne variait quant à elle de 1,2 à 87 µgC.l⁻¹.j⁻¹ à 2 m et de 2,0 à 56 µgC.l⁻¹.j⁻¹ à 50 m. La fraction de bactéries lysogéniques, c'est-à-dire la proportion de bactéries contentant des prophages, variait de 0 à 60% avec des valeurs plus élevées en hiver lorsque les abondances et le métabolisme des hôtes bactériens étaient les plus faibles. Ce résultat suggérait clairement que les bactéries puissent constituer un refuge pour les virus dans l'attente de conditions favorables à leur développement et prolifération (c'est-à-dire la mise en place d'un cycle lytique). Enfin, nous avons mesuré l'impact de la lyse virale sur la redistribution du carbone, et il était observé que la concentration de ce dernier (plusieurs dizaines de µg,l⁻¹,j⁻¹) augmentait au fur et à mesure de l'avancement dans la saison et pouvait participer à la demande carbonée du bactérioplancton. L'ensemble des résultats a permis de mettre en évidence combien le virioplancton est important quantitativement ainsi que son rôle potentiellement très important dans la structure et le fonctionnement du réseau trophique microbien du lac du Bourget, même en période hivernale.

Mots Clefs : Bactéries, Virus, dynamique, diversité, ressources nutritives

Abstract

Assessing the dynamics and functional role of bacteriophages in Lake Bourget

We analysed the dynamics of the aquatic viral community, as well as the impact of bacteriophages as causative agents of procaryotic mortality and their potential role in nutrient dynamics. For that, experiments were conducted, from January to May 2008, on water samples from two discrete depths of Lake Bourget (i.e. the largest natural French lake): the epilimnion (2 m) and the hypolimnion (50 m). Viral abundance varied from 4.10^7 to 8.10^7 part.ml⁻¹. Viral production varied from $3.4.10^5$ part.ml⁻¹.h⁻¹ (in March) to 2.10^6 part.ml⁻¹.h⁻¹ (in April) at 2 m and such a production was a bit higher at 50 m. Viral decay rates highest values were observed in the epilimnion, except in January, reaching in February 1.9 d^{-1} at 2 m and 0.2 d^{-1} at 50 m. Viruses could be responsible for 20 to 100% of daily bacterial mortality but this range should be recalculated because of the few number of bacteria observed by electron microscopy which could biais the results. It is noteworthy, however, that this parameter seems to vary significantly both during winter and spring, both at 2 and 50 m. Such variability could be associated to changes on bacterial community structure (as observed with PCR-DGGE), production and/or activity, mostly at 2 m in relation to changes in main environmental parameters (*i.e.* temperature, light, nutrients, chlorophyll a). Bacterial production varied from 1.2 to 87 μ gC.l⁻¹.d⁻¹ at 2 m and from 2.0 to 56 μ gC.l⁻¹.d⁻¹ ¹ at 50 m. Another parameter we measured was the lysogenic fraction, namely the percentage of bacteria containing prophages, which varied between 0 and 60%. Highest values were recorded in winter when bacterial abundance and metabolism were the lowest. This result could suggest that bacteria were assimilated to a survival strategy for viruses when the metabolic status of the host is low. At least, we made an estimation of the impact of viral lysis on carbon cycle. It was thus calculated that carbon concentration (tens of µg.l⁻¹.d⁻¹) increased over the course of the study at any depth and we speculate that this could play an important role towards the bacterioplankton carbon demand. On the whole, our results give a new evidence of the quantitative importance of the virioplankton, and of the importance of its potential roles in microbial food webs functioning of Lake Bourget, even in winter.

Key words: Bacterioplankton, viruses, dynamic, diversity, nutrients resources