



**HAL**  
open science

**MASTER Microbiologie, Environnement, Santé Mention  
Biologie Moléculaire et Cellulaire Spécialité  
Microbiologie Benoit PAIX Stéphan JACQUET (DR2  
INRA)  
Benoît Paix**

► **To cite this version:**

Benoît Paix. MASTER Microbiologie, Environnement, Santé Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire Spécialité Microbiologie Benoit PAIX Stéphan JACQUET (DR2 INRA). Sciences de l'environnement. 2016. hal-02916796

**HAL Id: hal-02916796**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02916796>**

Submitted on 18 Aug 2020

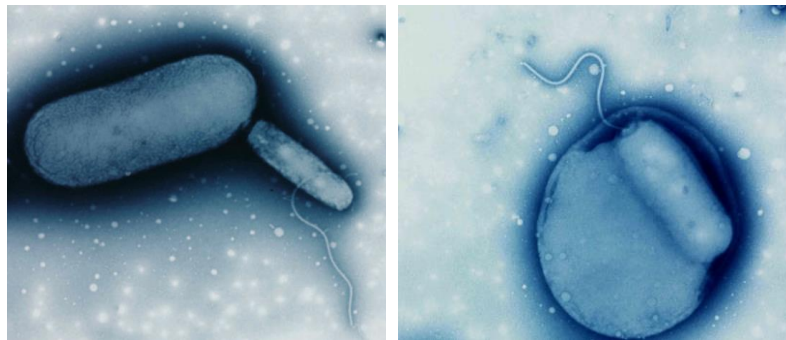
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

**MASTER Microbiologie, Environnement, Santé**  
Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Spécialité Microbiologie

Année 2015/2016

**Importance quantitative, structure et diversité des bactéries  
prédatrices de bactéries, les *Bdellovibrio* et organismes apparentés  
(BALOs), dans les grands lacs péri-alpins (Annecy, Bourget, Léman)**



© Sockett RE, 2006

Mémoire de stage présenté par

**Benoit PAIX**

5 Rue Bernoulli  
75008 Paris  
benoit.paix@gmail.com  
06 82 48 85 08

Directeur de stage

**Stéphan JACQUET (DR2 INRA)**

INRA, UMR CARTELE, 75 avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains, France  
stephan.jacquet@thonon.inra.fr  
04 50 26 78 12

## Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier **Stéphan JACQUET**, mon responsable de stage et directeur de recherche à l'INRA, pour m'avoir proposé ce sujet et accueilli au sein du CARRTEL. Son soutien, sa patience, sa pédagogie et son amitié m'ont été d'une grande aide durant ce stage. Je tiens à le remercier pour toutes ses relectures du rapport et aussi ses efforts à construire et déposer des sujets de thèse susceptibles de m'intéresser et de me les avoir proposés.

J'adresse aussi un immense merci à **Cécile CHARDON**, technicienne de recherche pour son aide technique apporté sur l'ensemble du stage ainsi que pour ses nombreux conseils avisés concernant la démarche expérimentale à suivre. Je tiens aussi à remercier **Brigitte LEBERRE** (assistante ingénieure), **Valentin VASSELON** et **Éric CAPO** (doctorants) pour l'aide complémentaire qu'ils ont pu m'apporter en biologie moléculaire et pour l'analyse de données.

J'adresse ensuite mes remerciements à **Pascal PERNEY**, **Jean-Christophe HUSTACHE** et **Guillaume LEFEBVRE**, les hommes de terrain, pour les prélèvements effectués en mon absence.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour m'avoir accueilli si chaleureusement, en particulier **Bernard MONTUELLE**, directeur du CARRTEL, notamment pour son aide apportée pour la préparation au concours de l'école doctorale de l'Université Savoie Mont-Blanc.

Un grand merci à **Edouard JURKEVITCH**, directeur de recherche, et son équipe au sein du département de microbiologie de l'Université Hébraïque de Jérusalem, pour nous avoir fourni bibliographie, expertise, différentes souches de BALOs, couples d'amorces et protocoles.

Merci à tous les « **jeunes** » du CARRTEL, pour tous ces moments exceptionnels passés en leur compagnie. Je leur souhaite à tous beaucoup de réussite et j'espère les revoir au plus vite.

Enfin, un immense merci à mes **proches**, pour m'avoir toujours soutenu, et ce depuis toujours.

# Sommaire

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>.....</b>
<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>6</b>
<b>Sites d'étude et stratégie d'échantillonnage.....</b>	<b>6</b>
Filtrations des prélèvements effectués .....	6
Extraction de l'ADN .....	6
Choix des amorces spécifiques des différents BALOs .....	6
Tests PCR de la spécificité des amorces et optimisation des conditions PCR.....	8
Clonage-séquençage pour la vérification des amorces .....	9
PCR-DGGE.....	9
Découpage et extraction d'ADN des bandes DGGE .....	10
Clonage-séquençage des bandes DGGE découpées .....	10
Traitement des séquences obtenues.....	10
PCR quantitative .....	10
Analyse des données.....	12
<i>Analyse phylogénétique des données de séquençage.....</i>	<i>12</i>
<i>Analyse comparative des données taxonomiques.....</i>	<i>12</i>
<i>Analyse des données d'abondance en relation avec les données environnementales .....</i>	<i>12</i>
<b>Résultats.....</b>	<b>13</b>
Vérifications et tests d'optimisation .....	13
<i>Dessin d'amorces qPCR ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des Peredibacteraceae .....</i>	<i>13</i>
<i>Vérification de l'ensemble des amorces : résultat des blasts .....</i>	<i>13</i>
<i>Tests d'optimisation et validation des gammes qPCR.....</i>	<i>14</i>
Relations entre l'abondance des BALOs et bactéries totales et de l'ensemble des données environnementales .....	17
Structure des différents BALOs révélée par l'analyse DGGE .....	17
Diversité des différents BALOs et répartition écologique .....	18
<b>Discussion .....</b>	<b>23</b>
<i>Les BALOs sont bien présents dans les grands lacs péri-alpins.....</i>	<i>23</i>
<i>Biais et limites.....</i>	<i>23</i>
<i>Diversité et abondance des Peredibacteraceae .....</i>	<i>23</i>
<i>Abondances et diversité des Bdellovibrionaceae et des Bacteriovoracaceae.....</i>	<i>24</i>
<i>Conclusion et perspectives.....</i>	<i>25</i>
<b>Résumé.....</b>	<b>35</b>

## Liste des abréviations

**ACP** : Analyse en Composante Principale

**BALOs** : *Bdellovibrio* And Like Organisms (*Bdellovibrio* et organismes apparentés)

**Bct** : Amorces ciblant l'ADN codant l'ARN 16S de l'ensemble des bactéries

**Bde** : Amorces ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des *Bdellovibrionaceae*

**Bx** : Amorces ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des *Bacteriovoraceae*

**CARTELE** : Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques

**Mutants « HI »** : Mutants « Host-Indépendant »

**NGS** : Next Generation Sequencing (synonyme de séquençage massif ou à haut débit)

**nMDS** : non-Metric MultiDimensional Scaling

**Per** : Amorces ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des *Peridibacteriaceae*

**PERMANOVA** : Permutational Multivariate Analysis of Variance (analyse multivariée par permutation en utilisant une matrice de distance).

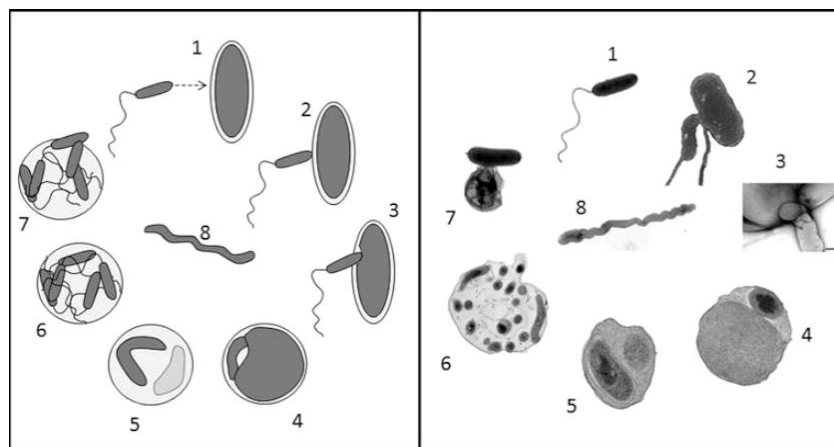
## Introduction générale

Les grands lacs péri-alpins (Annecy, Bourget, Léman) sont des écosystèmes aquatiques caractérisés par une communauté bactérienne auto- et hétérotrophe abondante (Comte *et al.*, 2006 ; Personnic *et al.*, 2009a ; Berdjeb *et al.*, 2011 ; Zhong & Jacquet, 2014) et sûrement très diversifiée (Comte *et al.*, 2006 ; Debroas *et al.*, 2009, Berdjeb *et al.*, 2011 ; Domaizon *et al.*, 2013). Différents facteurs biotiques et abiotiques structurent cette communauté. Les plus étudiés à ce jour ont été surtout les nutriments, les virus, ou encore les flagellés et ciliés hétérotrophes brouteurs (Domaizon *et al.*, 2003 ; Comte *et al.*, 2006 ; Personnic *et al.*, 2009b ; Thomas *et al.*, 2011 ; Berdjeb *et al.*, 2011). Les nutriments sont considérés comme étant le facteur majeur contrôlant la composition de la communauté des bactéries hétérotrophes (Berdjeb *et al.*, 2011), tandis que les virus et les petits hétérotrophes brouteurs affectent l'abondance, la structure et la diversité des bactéries en agissant de manière synergétique sur leur mortalité, avec un taux pouvant varier entre 10 et 60% de perte bactérienne par jour (Jacquet *et al.*, 2005 ; Sime-Ngando *et al.*, 2008 ; Thomas *et al.*, 2011). La structure de la communauté bactérienne serait donc d'abord contrôlée par la présence et la composition des nutriments (contrôle « bottom-up ») puis par les virus et la prédation (contrôle « top-down »). Cependant, parmi les organismes cellulaires, seuls les flagellés et les ciliés ont surtout été considérés comme les principaux prédateurs de bactéries dans les grands lacs péri-alpins (Domaizon *et al.*, 2003 ; Comte *et al.*, 2006 ; Berdjeb *et al.*, 2011). **La prédation des bactéries par d'autres bactéries n'a encore jamais été étudiée dans ces écosystèmes et on ne sait rien de la diversité, de l'abondance, de la distribution, de la dynamique et du rôle fonctionnel de ce type de prédateurs.**

Les bactéries prédatrices de bactéries les plus connues sont les *Bdellovibrio* et organismes apparentés (appelés par la suite BALOs, acronyme anglo-saxon identifiant les *Bdellovibrio And Like Organisms*). Les BALOs semblent très largement répandus dans les écosystèmes marins, lacustres et terrestres, mais il a été suggéré très récemment que leur abondance a été très largement sous-estimée (Rotem *et al.*, 2014). Les BALOs sont des bactéries gram négatif, prédateurs obligatoires d'autres bactéries gram négatif (Jurkevitch *et al.*, 2000). Le terme BALOs regroupe en fait divers groupes monophylogénétiques : le genre *Micavibrio* et les familles *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoraceae* et *Peridibacteraceae* (Rotem *et al.*, 2014 ; voir plus loin).

Le cycle de vie des BALOs est composé de deux phases : la première est une phase extracellulaire durant laquelle la bactérie recherche et contacte sa proie, tandis que la seconde phase consiste en la croissance et division cellulaire qui s'effectuent selon des stratégies différentes en fonction des types de BALOs. Les prédateurs épibiotiques tels que *Bdellovibrio exovorus* et *Micavibrio aeruginosavorus* s'attachent sur la bactérie proie, digèrent son contenu en restant à l'extérieur de celle-ci, puis se divisent (Davidov *et al.*, 2006 ; Koval *et al.*, 2013). Le cycle de vie des prédateurs périplasmiques tels que *Bdellovibrio bacteriovorus* est mieux connu que les prédateurs épibiotiques. Suite à la phase de recherche et d'attaque (**Fig. 1**, étape 1), *B. bacteriovorus* s'attache à sa proie grâce à des pili de type IV (Evans *et al.*, 2007) qui sont des polymères de pilines constituant des filaments extracellulaires impliqués dans l'adhésion des bactéries gram négatif (Craig *et al.*, 2004). L'attachement (**Fig. 1**, étape 2) est alors irréversible et l'enveloppe de la proie est alors lysée localement (Rotem *et al.*, 2014). La pénétration dans le périplasme (**Fig. 1**, étape 3), c'est-à-dire l'espace entre les membranes interne et externe, se fait ensuite par pincement et formation d'un pore à partir des pili (Evans *et al.*, 2007). Le peptidoglycane de la proie est modifié, formant ainsi ce que l'on appelle un bdelloplaste qui est

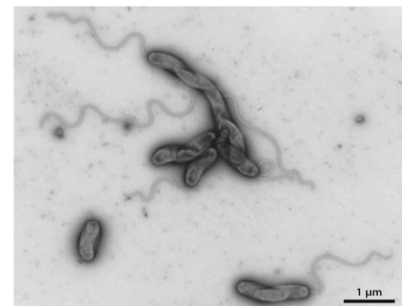
immunisé aux surinfections potentielles. La croissance de *B. bacteriovorus* dans l'espace périplasmique se fait alors de manière filamenteuse, où la bactérie présente une forme allongée (**Fig. 1**, étape 4 et 5). *B. bacteriovorus* dégrade alors une grande partie du contenu cytoplasmique dont 70% de l'ADN et 20 à 40% de l'ARN (Rotem *et al.*, 2014). La division de *B. bacteriovorus* s'effectue ensuite par différents cloisonnements synchrones du long filament (Fenton *et al.*, 2010). Lors de la phase de croissance et de division (**Fig. 1**, étape 6) le nombre de *Bdellovibrio* atteint un nombre moyen allant jusqu'à 30 prédateurs par proie chez l'hôte *Aquaspirillum serpens* (Rotem *et al.*, 2014). Une lyse du bdelloplaste provoque ensuite la formation de pores permettant ensuite la sortie des nouveaux *Bdellovibrio* de la proie (**Fig. 1**, étape 7). Ils entrent dès lors en phase d'attaque où ils vont poursuivre leurs développements notamment en augmentant leur taille (Fenton *et al.*, 2010).



**Figure 1** Cycle de vie de *Bdellovibrio bacteriovorus* (d'après Rotem *et al.*, 2014) : 1, Phase d'attaque. 2, Attachement. 3, Pénétration dans le périplasme. 4 à 6, Divisions et croissance. 7, Lyse de la proie et libération des bactéries. 8, Mutant hôte-indépendant.

Certaines souches de *Bdellovibrio* peuvent entrer dans une phase végétative dite de résistance, formant ainsi des bdellocystes, capable de persister dans la proie à des conditions de dessiccations de températures importantes (Rotem *et al.*, 2014).

Des formes mutantes de *Bdellovibrio bacteriovorus* sont capables de croître en l'absence de proies (**Fig. 1**, étape 8). Il s'agit de formes indépendantes de l'hôte nommées HI (Host Independent), isolées à partir de souches sauvages, cultivées avec un milieu riche sans proie. Ces mutants gardent cependant leur capacité de prédation, même si l'activité semble moins efficace que chez la souche parentale (Rotem *et al.*, 2014). Il s'agit donc de prédateurs facultatifs. On distingue parmi les mutants HI isolés le type I qui correspond aux mutants dépendants d'un milieu enrichi en extraits cellulaires : il s'agit de mutants saprophytes (utilisant la matière organique non vivante). Les mutants de type II résultent d'une deuxième mutation et ne requièrent pas la présence d'extraits cellulaires : il s'agit de mutants axéniques. La nature des molécules issues de la proie qui sont nécessaires à la croissance des



**Figure 2** Observation au microscope électronique à transmission des différents morphotypes de mutants HI (Sockett, 2009).

souches sauvages et saprophytes reste encore inconnue (Rotem *et al.*, 2014). La morphologie des mutants HI est très diversifiée (**Fig. 2**), avec des morphotypes tels que des formes axéniques, filamenteuses ou des phases d'attaque (Sockett, 2009).

Les BALOs sont retrouvés dans un grand nombre d'écosystèmes aquatiques dont l'océan, les environnements côtiers, les lacs, les estuaires, les rivières, les eaux usées et les étangs. Certains *Bdellovibrio* et organismes apparentés tels que *Micavibrio aeruginosavorus* colonisent notamment les biofilms qui se forment au niveau de ces habitats aquatiques, et agissent comme prédateurs dans ces niches microbiennes. On retrouve aussi ces prédateurs bactériens dans les écosystèmes terrestres tels que les sols, sédiments, rizières, racines des plantes, ou encore dans d'autres organismes tels que dans les branchies des crabes (Rotem *et al.*, 2014). La diversité taxonomique et la diversité d'habitats sont longtemps restées sous-estimées. Des approches indépendantes de la mise en culture, ciblant l'ADN codant pour l'ARNr 16S, ont révélé que la caractérisation d'isolats par culture ne permettait d'observer qu'un très faible pourcentage de cette diversité : la diversité cultivable des BALOs ne constituant à l'évidence qu'une petite fraction de la diversité réelle (Davidov *et al.*, 2006).

L'ensemble des BALOs représente un groupe polyphylétique ayant pour traits communs d'être des bactéries, toutes prédatrices obligatoires de bactéries, très motiles, avec un cycle de vie composé de deux phases : la phase de recherche et d'attaque et la phase de croissance et de division. Les BALOs sont classés dans les  $\alpha$ -protéobactéries avec le genre *Micavibrio* et surtout dans les  $\delta$ -protéobactéries où ils se divisent en trois familles : les *Bdellovibrionaceae*, les *Bacteriovoraceae* et les *Peridibacteriaceae* (Rotem *et al.*, 2014).

Parmi les *Bdellovibrionaceae*, il existe 9 groupes ou « clusters » (basés sur le critère des 97% de similarité entre séquences du gène codant pour l'ARNr 16S). Deux espèces sont bien caractérisées : *B. bacteriovorus* (**Fig. 3**) qui constitue l'espèce la plus étudiée des BALOs, avec une phase de croissance et de division périplasmique, et *B. exovorus* (**Fig. 4**) avec une phase de croissance et de division épibiotique en restant attachée à la paroi bactérienne (Davidov & Jurkevitch, 2004).

La famille des *Bacteriovoraceae* est représentée par 10 « clusters » phylogénétiques identifiés à partir d'une identité de séquences environnementales du gène codant l'ARNr16S à 96,5%. Parmi les espèces connues, il y a *Bacteriovorax marinus* et *B. litoralis* présentes dans l'eau de mer (Baer *et al.*, 2004), et *Bacteriolyticum stolpii* typique des eaux douces (Piñeiro *et al.*, 2008).

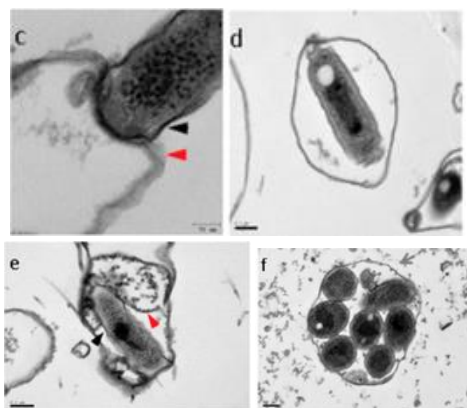
Les *Peridibacteriaceae* constituent une famille découverte et caractérisée plus récemment parmi les BALOs car ayant été finalement séparée des *Bacteriovoraceae*. *Peridibacter starii* semble, à ce jour, le principal représentant connu cultivé de cette famille (Davidov & Jurkevitch, 2004). Cependant l'affiliation de *Bacteriolyticum stolpii* aux *Peridibacteraceae* et non aux *Bacteriovoraceae* est actuellement reconsidérée, de par la proximité taxonomique, et physiologique lié au milieu de vie (en eau douce) similaire à *Peridibacter starii* (Rotem *et al.*, 2014). Dans le cadre de cette étude l'affiliation des *Bacteriolyticum stolpii* sera considérée et comparée au sein de la diversité et la phylogénie de chacune des deux familles.

Le genre *Micavibrio* est représenté par deux espèces : *M. admirantus* et *M. aeruginosavorus* (Rotem *et al.*, 2014). De manière similaire à *B. exovorus* (souche JSS), les *Micavibrio* ne présentent pas de phase de croissance et de division périplasmique, mais restent extracellulaires durant tout leur cycle de vie (**Fig. 5**, Davidov *et al.*, 2006). Les *Micavibrio* sont globalement

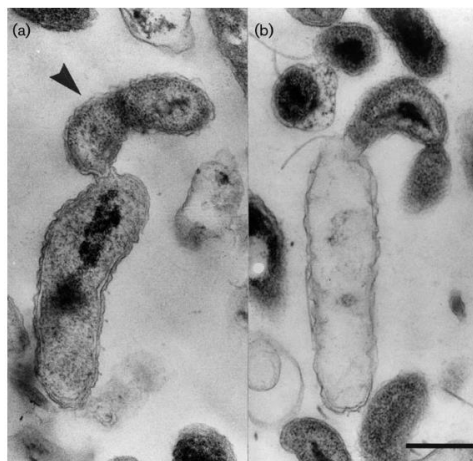


moins renseignés car peu de séquences environnementales et de souches cultivées sont disponibles (Rotem *et al.*, 2014).

Enfin, notons que les *Bdellovibrionaceae* et les *Peridibacteriaceae* ont été isolés dans l'eau douce et les sols tandis les *Bacteriovoracaceae* sont plus largement distribués puisqu'un des clusters est aussi retrouvé dans l'eau de mer (Piñeiro *et al.*, 2007).



**Figure 3** Observation en microscopie électronique à transmission d'une souche de *B. bacteriovorus* HD100 et d'une cellule fantôme (Bactérie vide). (Rotem *et al.*, 2015) (c) Phase d'attaque : *B. bacteriovorus* s'attache à la cellule fantôme (d), (e) et (f) Phase de croissance et division : *B. bacteriovorus* se développe dans la cellule fantôme.



**Figure 4** Observation en microscopie électronique à transmission d'une souche *B. exovorus* JSS attachée à sa proie *Caulobacter crescentus* (Koval *et al.*, 2013) - (a) *B. exovorus* se fixe après avoir « traquée » sa proie. (b) *B. exovorus* vide le contenu cytoplasmique de sa proie qui conserve la même forme initiale.



**Figure 5** Observations en microscopie électronique à transmission de la souche *Micavibrio* sp. EPB. (Davidov *et al.*, 2006) A. Forme libre de *Micavibrio* sp. EPB. B. Forme attachée de *Micavibrio* sp. EPB sur un *Pseudomonas corrugata* (Pp) vidé de son contenu cytoplasmique.

Les travaux de Roux *et al.* (2012) puis de Zhong *et al.* (2015) ont montré qu'il existe une communauté de virus à ADN simple brin, les *Microviridae*, qui est abondante et diversifiée dans les lacs péri-alpins. Cette communauté présente une dynamique caractéristique, et la corrélation entre l'abondance de ces virus et l'abondance des bactéries hétérotrophes reste difficile à établir (Zhong *et al.*, 2015). Cependant certains virus *Microviridae* sont connus pour être des parasites de *Bdellovibrio* tel que *B. bacteriovorus* (Brentlinger *et al.*, 2002). La présence d'une communauté abondante et diversifiée de virus à ADN simple brin dans les grands lacs péri-alpins laisse penser qu'il pourrait exister une abondance et diversité d'hôtes relativement importante, parmi lesquels des *BALOs*. Ces derniers, de par leurs interactions trophiques potentielles avec les autres communautés de bactéries, pourraient jouer un rôle non négligeable dans le

fonctionnement du compartiment microbien. Il est donc critique d'étudier et comprendre l'abondance, la distribution et la diversité de ces prédateurs bactériens ainsi que leurs incidence écologique sur le réseau trophique de ces écosystèmes (Perez *et al.*, 2016 ; Williams *et al.*, 2016).

L'objectif principal de ce travail a été de révéler pour la première fois l'existence de BALOs au sein des grands lacs péri-alpins (Annecy, Bourget, Léman). Les questions posées ont été les suivantes :

- Peut-on détecter facilement des BALOs dans les grands lacs péri-alpins ?
- Quelle est la structure et la diversité des BALOs ?
- Quelle est l'importance quantitative des groupes principaux parmi cette communauté de bactéries prédatrices ?
- Peut-on mettre en évidence des relations (entre abondances et/ou structure) entre la communauté des BALOs et celle des bactéries hétérotrophes dans son ensemble ?
- Quels facteurs environnementaux semblent importants dans la régulation de ces interactions ?

## Matériels et Méthodes

### Sites d'étude et stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage a été effectué à la station de référence des 3 plus grands lacs naturels profonds péri-alpins que sont les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy. Ces écosystèmes sont caractérisés par des statuts trophiques différents : mésotrophe pour le Léman, oligo-mésotrophe pour le lac du Bourget, et oligotrophe pour le lac d'Annecy (Jacquet *et al.*, 2012, 2014). Les prélèvements ont été effectués à différentes profondeurs, caractéristiques de l'épi-, méta- et hypolimnion : 2 m, 15 m, 50 m et 100 m de profondeur pour les lacs Léman et du Bourget ; et à 3 m, 15 m, et 45 m pour le lac d'Annecy (qui est moins profond). Ces prélèvements ont été effectués en moyenne une fois par mois pour chaque lac (exception faite du lac d'Annecy) sur la période s'étalant entre août 2015 et janvier 2016 inclus, représentant en tout 60 prélèvements. Une carte présentant les lacs et les différents sites d'échantillonnage est présentée en **Annexe**.

### Filtrations des prélèvements effectués

Pour chaque profondeur, entre 700 mL et 1 litre d'eau a été filtrée de manière successive à travers deux types de filtre polycarbonate de 47 mm de diamètre, le premier de porosité 2  $\mu\text{m}$  (permettant de récupérer les bactéries attachées aux « grosses » particules), l'eau ainsi obtenue étant alors filtrée à nouveau sur le second filtre de porosité 0,2  $\mu\text{m}$  (pour récupérer uniquement les bactéries dites libres). Un total de 120 filtres a ainsi été obtenu.

### Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée en utilisant le kit GenElute™ de chez Sigma-Aldrich (en suivant les recommandations du fournisseur), ce dernier ayant été testé en amont du stage et donnant les meilleurs résultats, comparativement à d'autres kits et/ou méthodes d'extraction. L'ADN de cultures de différentes souches de BALOs (fournies par le Docteur Edouard Jurkevitch) a également été extrait pour avoir des témoins positifs permettant de vérifier la spécificité des différentes amorces (voir plus bas). Les souches fournies étaient nommées HD100 et 109J, représentatives de *Bdellovibrio bacteriovorus*, et A3.12, représentative de *Peredibacter starrii*. L'extraction de l'ADN des différentes souches a été réalisée à partir du même protocole que l'extraction d'ADN des filtres avec une étape de pré-centrifugation (10 min, 4°C, 13000 g) pour obtenir un culot bactérien à partir de la culture liquide. L'ADN a été dosé par spectrophotométrie en utilisant le système Nanodrop 1000 pour vérifier la concentration et la qualité de l'ADN avec le rapport A260/A280. Une moyenne sur trois réplicats de mesure a alors été réalisée. Les concentrations moyennes et les rapports A260/A280 mesurés pour chaque extrait sont rapportés en **Annexe**.

### Choix des amorces spécifiques des différents BALOs

Les couples d'amorces ciblant partiellement l'ADN codant l'ARN 16S bactérien choisis pour cette étude sont spécifiques des trois familles de BALOs les plus représentées d'après la bibliographie : les *Bdellovibrionaceae*, les *Bacteriovoracaceae* et les *Peredibacteriaceae*. Nous avons sélectionné et testé i) différentes amorces issues des travaux pré-existants, plus particulièrement ceux réalisés par l'équipe d'E. Jurkevitch que nous avons aussi contacté (et à qui nous avons fait connaître régulièrement l'avancement de ces travaux) et ii) nos propres amorces (dessinées au cours du stage). Ces couples d'amorces ont été utilisés afin d'amplifier

l'ADN dans le but d'obtenir des empreintes génétiques et affilier phylogénétiquement les différentes séquences de BALOs obtenues par PCR-DGGE et clonage séquençage, ou pour quantifier l'abondance des différents BALOs par qPCR. L'ensemble des caractéristiques de ces couples d'amorces est résumé dans le **Tableau I** ci-dessous.

**Tableau I** Détails des différents couples d'amorces testées.

Nom du couple	Nom des amorces	Sens	Séquence (5'-3')	Taille amplicon	Type d'analyse prévue	Population cible	Référence							
Couple Bde1	BbeF216	Forward	TTTCGCTCTAAGATGAGTCCGCGT	492	Non utilisé	<i>Bdellovibrionaceae</i>	Essche <i>et al</i> , 2009							
	BbeR707	Reverse	TTGCCTCCGGTATTCTGTGAT											
Couple Bde2	Bde347F	Forward	GGAGGCAGCAGTAGGGAATA	203	qPCR			<i>Bdellovibrionaceae</i>	Davidov <i>et al</i> , 2006					
	Bde549R	Reverse	GCTAGGATCCCTCGTCTTACC											
Couple Bde3	Bde529F	Forward	GGTAAGACGAGGGATCCT	479	PCR-DGGE & clonage séquençage					<i>Bacteriovoraceae</i>	Zheng <i>et al</i> , 2008			
	Bde1007R	Reverse	TCTCCAGTACATGTCAAG											
Couple Bx4	Bx519	Forward	CAGCAGCCGCGTAATAC	159	qPCR		<i>Bacteriovoraceae</i>					Davidov <i>et al</i> , 2006		
	Bx677	Reverse	CGGATTTTACCCTACATGC											
Couple Bx5	Bx1442R	Reverse	GCCACGGCTTCAGGTAAG	767	Non utilisé			<i>Peridibacteriaceae</i>	Marchesi <i>et al</i> , 1998					
	Bx676F	Forward	ATTCGCATGTAGGGTA											
Couple Per6	Per676F	Forward	ATTCACGTGTAGGGTA	768	PCR-DGGE & clonage séquençage						<i>Bacteria</i>		Heuer <i>et al</i> , 1998	
	Per1443R	Reverse	AGTCACGTCTTAAATGAAA											
Couple Bct8	63F	Forward	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	1316	PCR nichée	<i>Bacteria</i>						Kandel <i>et al</i> , 2014		
	1378R	Reverse	CGGTGTGTACAAGCCCGGAACG											
Couple Bct7	519F	Forward	CAGCMGCCGCGTAATWC	389	qPCR				<i>Bdellovibrionaceae</i>					Pasternak <i>et al.</i> , 2013
	907R	Reverse	CCGTC AATTCMTTTRAGTTT											
Couple Bde9	Bd824F	Forward	ACTTGTTGTTGGAGGTAT	399	Non utilisé					<i>Bacteriovoraceae</i>			Dessinées au cours du stage	
	Bd1222R	Reverse	TTGTAGCACGTGTGTAG											
Couple Bx10	Bx341F	Forward	CTACGGGAGGCAGCAG	332	PCR-DGGE & clonage séquençage		<i>Peridibacteriaceae</i>							
	Bx672R	Reverse	TACCCCTACATGCCAAATTCC											
Couple Per11	Per699F	Forward	CTGCCTGGACGACTATTGAC	276	qPCR			<i>Peridibacteriaceae</i>						
	Per974R	Reverse	CGGGTTCGTAGGAGTTCAAG											
Couple Per12	Per521F	Forward	GAAACTGCGTCTGAACTGC	234	Non utilisé						<i>Peridibacteriaceae</i>			
	Per754R	Reverse	GCGTCACTGAAGGAGTCAAT											

**En gras** : les couples d'amorces sélectionnées après les tests.

Les amorces utilisées pour effectuer l'approche PCR-DGGE et de clonage séquençage, amplifient des fragments de l'ADN codant l'ARN 16S d'une taille supérieure à 300 pb, tandis que les amorces testées pour effectuer l'approche qPCR amplifient des fragments de l'ADN codant l'ARN 16S d'une taille inférieure à 300 pb (la taille de l'amplicon étant un critère critique pour les deux approches). Des tests « in silico » ont été réalisés en blastant chacune de ces amorces pour vérifier si celles-ci amplifiaient bien les séquences d'ADN codant l'ARN 16S des groupes ciblés. Ces tests « in silico » ont été réalisés à partir de l'outil NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Aucun couple d'amorces n'existait pour réaliser des PCR quantitatives ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des *Peredibacteraceae*. Nous avons donc dessiné et testé des couples d'amorces dans ce but. Le dessin des amorces a été réalisé à partir de l'outil NCBI/Primer-BLAST avec comme séquence de référence des séquences d'ADN partiels codant l'ARN 16S de *Peredibacter starrii* A3.13. L'ensemble de l'approche utilisée pour dessiner les couples d'amorces est présenté en **Annexe**. Deux couples d'amorces ont été sélectionnés, nommés Per11 et Per12. Le détail de ces amorces est aussi présenté ci-dessus dans le **Tableau I**.

### **Tests PCR de la spécificité des amorces et optimisation des conditions PCR**

La spécificité de toutes les amorces a été vérifiée et leur utilisation en PCR optimisée. Afin de réaliser l'optimisation des conditions PCR et tester la spécificité des amorces, un « pool d'ADN » regroupant 1 µL de chacun des 120 extraits d'ADN a été effectué. Ce « pool environnemental » a été préparé dans le but d'effectuer les tests sur un échantillon global représentatif de l'ensemble de la diversité et de l'abondance moyenne de la communauté des BALOs présente au sein de nos échantillons (sans discrimination de période, de lac, de profondeur et de type de filtre).

L'ensemble des vérifications a été effectué en deux temps : i) une première vérification, sur gel d'agarose-Bet, de la présence d'un signal amplifié unique, sans aspécificité, migrant à la taille attendue de l'amplicon ; ii) une vérification des séquences amplifiées par clonage-séquençage (de type Sanger, réalisé par la compagnie GATC Biotech) afin de s'assurer que les séquences obtenues correspondaient bien aux séquences d'ADN codant l'ARN 16S de la population ciblée.

Les premières vérifications PCR sur gel d'agarose-Bet ont donc d'abord permis de s'assurer de la spécificité du signal, de la bonne migration à la taille attendue avec les amorces sur des pools environnementaux et les témoins positifs (c'est-à-dire les extraits d'ADN de cultures de souches représentatives de la population ciblée). Les conditions PCR ont été optimisées en faisant varier la température d'hybridation, le nombre de cycle et la quantité d'ADN par réaction afin d'obtenir le signal le plus spécifique possible. L'ensemble des conditions PCR testées et l'optimum sont présentés dans le **Tableau II** ci-dessous.

Si aucun signal n'était visible suite à une PCR classique, et ce quel que soit les conditions testées, des PCR nichées ont alors été réalisées pour « booster » le signal. Les PCR nichées ont été réalisées à partir d'une première amplification des séquences d'ADN codant l'ARN 16S de l'ensemble des bactéries (à partir du couple d'amorces Bct8). Le produit PCR obtenu après cette première amplification a ensuite été purifié à partir du Kit Illustra GFX DNA and Gel purification Kit (GE HealthCare™). Une seconde amplification PCR a alors été réalisée à partir des couples d'amorces amplifiant de manière spécifique une des familles ciblées parmi les séquences d'ADN codant l'ARN 16S déjà amplifiées de l'ensemble des bactéries.

L'ensemble des PCR a été réalisé à partir du kit BioTaq DNA Polymerase (Bioline™), avec le thermocycleur Tprofessional Basic Gradient (Biometra™) en suivant les recommandations du fournisseur. L'ensemble des qPCR a été effectué avec le kit QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen™), avec le thermocycleur Rotor-Gene Q (Qiagen™) en suivant les recommandations du fournisseur.

**Tableau II** Conditions PCR testées pour chaque couple d'amorces.

Nom des couples d'amorces	Type de test	Conditions PCR testées		
		Température d'hybridation	Quantité d'ADN *	Nombre de cycles
Couple Bde1	PCR	49°C, 51°C, 55°C, 56°C, 58°C.	1 et 2 mL	36 cycles
Couple Bde2	PCR	49°C, 51°C, 55°C, 56°C, 58°C.	1 mL	36 cycles
	qPCR	60°C.	1 mL	45 cycles
Couple Bde3	PCR	49°C, 51°C, 55°C, 56°C, 58°C.	1 et 2 mL	36 cycles
Couple Bde9	PCR	48°C, 52°C.	1 mL	36 cycles
Couple Bx4	PCR	49°C, 54°C, 56°C, 58°C.	1 mL	36 cycles
	qPCR	58°C, 60°C.	1 et 2 mL	45 cycles
Couple Bx5	PCR	49°C, 51°C, 55°C, 56°C, 58°C.	1 et 2 mL	36 cycles
Couple Bx10	PCR	48°C, 52°C.	1 mL	36 cycles
Couple Per6	PCR	49°C, 51°C, 55°C, 56°C, 58°C.	1 mL	36 cycles
Couple Bct7	PCR	50°C.	1 mL	36 cycles
	qPCR	52°C.	1 mL	30, 40 et 45 cycles
Couple Bct8	PCR	48°C, 50 et 52°C.	1 mL	36 cycles
Couple Bct 8 + Couple Bde3	1 <sup>ère</sup> amplification de PCR nichée	Couple 8 : 50°C.	1 mL	20 cycles
	2 <sup>ème</sup> amplification de PCR nichée	Couple 3 : 51°C.	1 mL	20 cycles
Couple Bct8 + Couple Bx10	1 <sup>ère</sup> amplification de PCR nichée	Couple 8 : 50°C.	1 mL	20 cycles
	2 <sup>ème</sup> amplification de PCR nichée	Couple 10 : 54°C.	1 mL	20 cycles
Couple Per11	PCR	53°C	1 et 2 mL	36 cycles
	qPCR	53°C	1 et 2 mL	45 cycles
Couple Per12	PCR	53°C	1 et 2 mL	36 cycles

### Clonage-séquençage pour la vérification des amorces

L'approche par clonage-séquençage a été utilisée pour (i) vérifier la spécificité de toutes les amorces et (ii) pour obtenir le plus de séquences possibles pour déterminer la diversité des BALOs dans les grands lacs péri-alpins. Le pool environnemental cité ci-dessus a été amplifié par 3 couples d'amorces spécifiques des *Bdellovibrionaceae* (couple Bde3), des *Bacteriovoracaceae* (couple Bx10) et des *Peredibacteraceae* (couple Per6).

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit Illustra GFX PCR et le Gel Band Purification Kit (GE Healthcare<sup>TM</sup>), en suivant le protocole du fournisseur. La concentration d'ADN purifié de chaque produit PCR a été dosée au Nanodrop 1000 (ThermoScientific<sup>TM</sup>).

Le clonage a été effectué à partir du Kit TA TOPO cloning d'Invitrogen<sup>TM</sup>, en suivant les recommandations du fournisseur et le protocole du plateau de biologie moléculaire du laboratoire. Pour chaque amorce, au moins 8 clones ont été choisis sur différentes boîtes de pétri. Chaque clone a été resuspendu dans 20 µL d'eau stérile. Une amplification PCR a ensuite été réalisée à partir de chaque clone resuspendu en utilisant les amorces M13 forward et reverse. Une vérification sur gel d'agarose-Bet a alors été effectuée pour s'assurer que la séquence d'intérêt était bien insérée en fonction de la taille de l'amplicon mesurée à partir du gel. Chaque produit PCR amplifié avec les amorces M13 a été envoyé à purifier puis séquencer chez la compagnie GATC Biotech<sup>TM</sup>.

### PCR-DGGE

Des amorces Bde3F, Bx10F et Per6R ont été commandées avec la queue GC (GC-clamp), présentée ci-après, rajoutée au niveau 5' des amorces afin d'effectuer les PCR nécessaires pour la migration avec gel DGGE. Cette queue GC (CCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGG sens 5' → 3') a été choisie d'après les travaux de Davidov *et al.* (2006).

Les gels DGGE ont été optimisés à partir du protocole développé par le plateau de biologie moléculaire du laboratoire en suivant les instructions du fournisseur de la cuve DGGE

CBS Scientific company. Les gels ont été réalisés avec une épaisseur de 1 mm avec un premier gel composé d'un gradient linéaire formamide/urée optimisé allant finalement de 40% à 55%, suivi d'un gel superposé sans agents dénaturants. Chaque électrophorèse a été réalisée avec un temps de migration optimisé de 16 h à 120 V, à 60°C. Les gels ont ensuite été colorés à l'obscurité pendant 45 minutes avec 40 mL de tampon TAE 1X et 8 µL de SYBR 2X gold (recommandation du fournisseur Applied Math NV). Plus de détails sont fournis dans Berdjeb *et al.* (2011, 2013).

L'analyse des gels est restée simplement visuelle sans utiliser d'outils comme GelCompar comme imaginé à l'origine, au regard du nombre très limité de bandes obtenues (voir la section Résultats).

### **Découpage et extraction d'ADN des bandes DGGE**

Le séquençage a été opéré sur l'ADN découpé à partir d'une sélection de bandes DGGE. Dans ce but, le gel a été placé sous une lampe UV (GelDoc BioRad™) en minimisant au maximum le temps d'exposition et chaque bande visible sous UV a été découpée le plus rapidement possible afin de ne pas dégrader l'ADN. Les bandes ont été conservées dans 20 µL de tampon d'extraction à -20°C. L'extraction de l'ADN des bandes DGGE a été effectuée en incubant chaque tube 20 minutes à -80°C (congélation), suivi de 20 minutes à 4°C (décongélation). Les tubes ont été ensuite centrifugés 10 minutes à 13000 rpm à 4°C et le surnageant a été conservé.

### **Clonage-séquençage des bandes DGGE découpées**

L'ADN extrait des bandes a de nouveau été amplifié par PCR avec toutes les amorces retenues afin de vérifier l'état de l'ADN et la spécificité de l'amplification. Les différentes étapes du clonage suivies pour les produits PCR issues des bandes DGGE ont été effectuées dans les mêmes conditions que précédemment décrites.

### **Traitement des séquences obtenues**

Des « séquences de référence » de l'ADN codant l'ARN 16S des différentes familles de BALOs étudiées ont été recherchées sur la base de données NCBI-nucléotide. Ces séquences de référence ont été choisies en paramétrant les critères de recherche sous NCBI comme suit: (i) séquences codant l'ARN ribosomal 16S, (ii) taille supérieure à 1000 pb, (iii) mise en ligne des séquences ou reclassification après 2012. Au total, 32, 39 et 14 séquences affiliées respectivement aux *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoracaceae* et *Peredibacteraceae* ont été utilisées. Six autres séquences de référence appartenant à d'autres δ-Protéobactéries ont aussi été sélectionnées pour l'analyse afin de s'assurer que les arbres phylogénétiques des différentes familles de BALOs se retrouvent correctement enracinés au sein des δ-Protéobactéries. L'ensemble des séquences de références est regroupé en **Annexe**. Nos séquences ont été alignées avec des séquences de références de la même famille à partir du logiciel MEGA6, par la méthode ClustalW. Un nettoyage de chaque séquence, consistant notamment en la suppression des régions situées entre la zone M13 Forward et Reverse et le site d'insertion, a été effectué afin d'optimiser l'analyse phylogénétique (voir plus bas).

### **PCR quantitative**

La mise au point des différentes gammes étalons pour l'analyse de PCR quantitative (qPCR) a été réalisée à partir de différents plasmides linéarisés de clones ayant intégré différents fragments amplifiés ciblés par les différentes amorces qPCR. L'ADN plasmidique des clones choisis a été extrait à partir du kit Illustra GFX PCR et le Gel Band Purification Kit (GE Healthcare™) en

suivant les recommandations du fournisseur. Le choix des enzymes de restrictions permettant de linéariser le plasmide a été effectué en s'assurant qu'il n'existe qu'un seul site de restriction de l'enzyme dans le plasmide ayant inséré l'amplicon. L'enzyme choisie pour les plasmides ayant reçu les inserts spécifiques des amorces Bde2, Bx4, Bct7 est HindIII. L'enzyme choisie pour le plasmide ayant reçu l'insert spécifique de l'amorce Per11 est XhoI. Une vérification sur gel d'agarose-BET a alors été réalisée pour s'assurer que le plasmide était linéarisé en un seul fragment. Les différentes étapes pour la réalisation des gammes ont été effectuées en suivant le protocole du plateau de biologie moléculaire du laboratoire

Les gammes ont été mises au point à partir de dilutions successives au 1/10. Un dosage au Nanodrop 1000 a été effectué pour déterminer la concentration en ADN du premier point de gamme (non dilué) et ainsi calculer le nombre de copies du gène cible du premier point de gamme à partir de la formule suivante d'après Zheng *et al.* (2008) :

$$N_{copies} = \frac{[ADN] * N_A}{T_{plasmide} * M_{pb}}$$

avec  $N_{copies}$  : nombre de copies du gène ciblé pour 25  $\mu$ L de réaction qPCR,  $[ADN]$  : concentration en ADN directement mesurée au Nanodrop 1000 en g/ $\mu$ L,  $T_{plasmide}$  : taille du plasmide utilisé en paires de bases,  $M_{pb}$  : masse molaire d'une paire de base, soit 660 g/mol et  $N_A$  : constante d'Avogadro, soit  $6.02 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Trois réplicats de gammes qPCR ont été réalisés pour fixer un seuil de Ct (Threshold) permettant d'optimiser au maximum les paramètres de la droite d'étalonnage d'équation  $f(\log \text{ quantity}) = Ct$ . Les valeurs maximales et minimales des paramètres pour valider la droite d'étalonnage sont présentées dans le **Tableau III** ci-dessous.

**Tableau III** Valeurs min. et max. des paramètres pour valider les gammes qPCR.

	Valeur minimum	Valeur maximum
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99	1
<b>Pente (M)</b>	-3,74	-3,1
<b>Efficacité</b>	0,85	1,10

Pour chaque gamme, un minimum de 5 points de gammes a été conservé en s'assurant que la gamme soit la plus étendue possible pour éviter que certains échantillons soient hors gamme.

Le calcul permettant de déterminer le nombre de copies d'ADN ciblé par les amorces, par mL d'eau filtré à partir du nombre de copies d'ADN ciblé par les amorces lors dans un volume de réaction qPCR prenait en compte les différentes étapes expérimentales (dilution, concentration). Au final, le nombre de copies par mL d'eau filtré a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$N = \frac{n * V_{qPCR} * V_{elution}}{V_{filtré}}$$

avec  $N$  : nombre de copies par  $\mu$ L d'eau filtré,  $n$  : nombre de copies mesurée dans un volume de mix PCR,  $V_{qPCR}$  : volume du mix qPCR,  $V_{elution}$  : volume d'élution utilisé suite à l'extraction d'ADN du filtre, et  $V_{filtré}$  : volume filtré - ici : Nombre de copies par mL = ((Nb de copies par réaction \* 25 \* 30)/(volume filtré)



Afin d'obtenir une estimation de l'abondance des différentes familles de BALOs vis-à-vis de l'ensemble des bactéries, le nombre de copies de séquences d'ADN codant l'ARN 16S de chaque famille de BALOs par mL d'eau filtré a aussi été rapporté au nombre de copies de séquences d'ADN codant l'ARN16S de l'ensemble des bactéries.

L'ensemble des qPCR a été réalisé en duplicats avec le kit QuantiTect SYBR® Green PCR Kit, avec le thermocycleur Rotor-Gene Q, en suivant les recommandations du même fournisseur (Qiagen™) et le protocole du plateau de biologie moléculaire du laboratoire.

## **Analyse des données**

### *Analyse phylogénétique des données de séquençage*

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec le logiciel MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) à partir des différents alignements de séquences effectués par les méthodes ClustalW et MUSCLE. Les méthodes statistiques testées pour la construction des arbres ont été le « Maximum Likelihood Tree » et le « Neighbor Joining Tree ». L'arbre a été réalisé avec une répétition de 1000 Bootstraps.

### *Analyse comparative des données taxonomiques*

Des analyses de type nMDS ont été réalisées afin de comparer le regroupement de l'ensemble des séquences obtenues et récupérées, en lien avec les différents types de milieux étudiés. L'analyse est basée sur la construction d'une matrice de dissimilarité entre les séquences (matrice de Bray-Curtis), réalisée à partir du logiciel Mothur. Les données issues de cette matrice sont ensuite analysées sous le logiciel R pour générer une nMDS à deux dimensions à partir des packages *vegan* et *rgl*. Des analyses statistiques ont été menées sous R en réalisant plusieurs PERMANOVA répétées pour vérifier la significativité du regroupement des séquences en différents clusters à partir de la « p-value ».

### *Analyse des données d'abondance en relation avec les données environnementales*

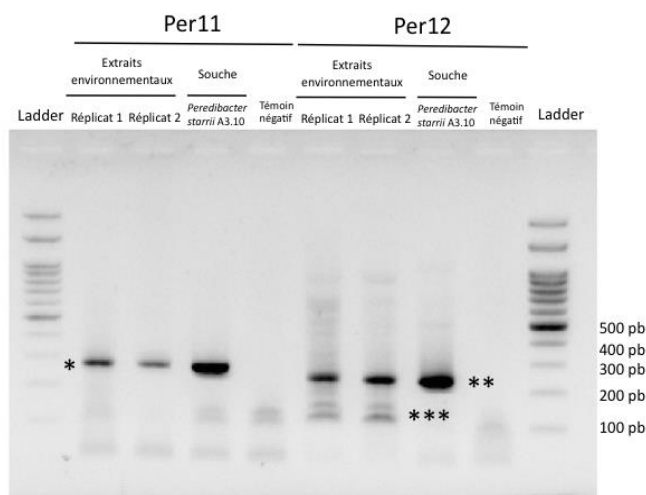
Une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée en tenant compte de l'ensemble des données environnementales disponibles dans le cadre du suivi écologique des grands lacs alpins afin de mettre en évidence des relations ou l'absence de relations entre les abondances des différentes bactéries prédatrices et totales (obtenues par qPCR) avec les facteurs environnementaux. Une matrice constituée de 32 lignes (les 3 lacs, les différentes dates et les deux profondeurs) et de 14 colonnes (avec les différents paramètres écologiques suivants : température, phosphore total, orthophosphates, nitrates, ammonium, oxygène dissous, chlorophylle *a*, pH, conductivité) a été constituée et analysée à partir du logiciel XLStats™ et du logiciel R. Les analyses statistiques ont donné les mêmes résultats sous R et avec XLStats™.

## Résultats

### Vérifications et tests d'optimisation

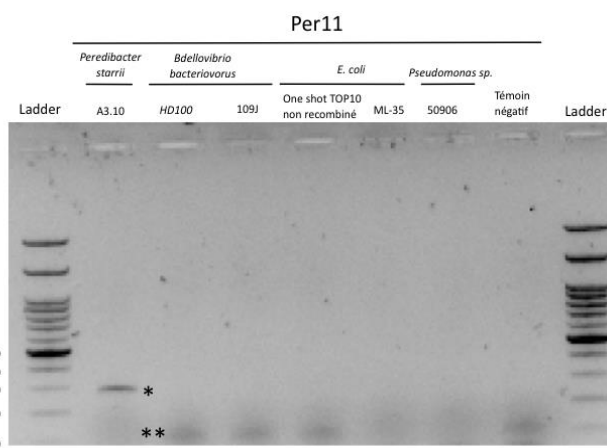
Dessin d'amorces qPCR ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des *Peredibacteraceae*

Les deux couples d'amorces sélectionnés (Per11 et Per12) ciblant l'ADN codant l'ARN 16S des *Peredibacteraceae*, suite aux différents tests *in silico*, ont été testés et vérifiés en PCR *in vivo*. Les conditions PCR optimisées pour ces amorces sont présentées plus haut dans le **Tableau II**. Les gels révélant les amplifications PCR réalisées avec les couples d'amorces Per11 et Per12 sont présentés dans la **Figure 6**.



**Figure 6** Photo détaillée du gel obtenu après amplification PCR avec les amorces Per 11 et Per12.

- \* Bandes d'intérêt à 276 pb.
- \*\* Bandes d'intérêt à 248 pb.
- \*\*\* Bandes aspécifiques.



**Figure 7** Photo détaillée du gel obtenu après amplification PCR pour vérifier la spécificité de l'amorce Per11.

- \* : Bandes d'intérêt à 276 pb.
- \*\* : Couples d'amorces résiduels.

On observe pour l'amplification PCR avec le couple Per11 un signal net de la taille attendue (soit 276 pb), en présence d'ADN d'extraits environnementaux et de la souche *Peredibacter starii* A3.12 (**Fig. 7**). Comparativement, le signal observé pour l'amplification PCR avec le couple Per12 présente un signal d'une taille attendue (soit 248 pb) mais avec une certaine aspécificité. Par conséquent nous avons opté pour le couple d'amorce Per11 afin de réaliser l'ensemble des qPCR pour quantifier les *Peredibacteraceae*.

Des tests PCR ont alors été réalisés pour vérifier si le couple d'amorce Per11 amplifiait ou non des extraits d'ADN de souches n'appartenant pas aux *Peredibacteraceae* (extraits « contrôles »). Ces extraits d'ADN étaient issus d'extraits de souches de *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 et *B. bacteriovorus* 109J, taxonomiquement proches des *Peredibacteraceae*, et des souches d'*E. coli* ML35, *Pseudomonas sp.* 50906.

La vérification de la spécificité du couple d'amorce sélectionné a été effectuée par ailleurs par clonage et séquençage de l'ADN amplifié et purifié.

### Vérification de l'ensemble des amorces : résultat des blasts

Les résultats des blasts sont résumés en **Annexe** et permettent de vérifier que chaque couple d'amorces amplifiait bien de manière spécifique, à la fois pour les amorces déjà existantes mais aussi pour les amorces dessinées au cours du stage.

### *Tests d'optimisation et validation des gammes qPCR*

Toutes les gammes qPCR pour chacun des « runs » qPCR en suivant les paramètres indiquées précédemment, les Ct, les droites d'étalonnages ainsi que leurs paramètres : R, R<sup>2</sup>, M (pente) et efficacité sont présentés en **Annexe**, révélant le succès des tests et la possibilité de déterminer avec précision les abondances des différents BALOs ciblés.

### **Abondances et distribution des différents BALOs**

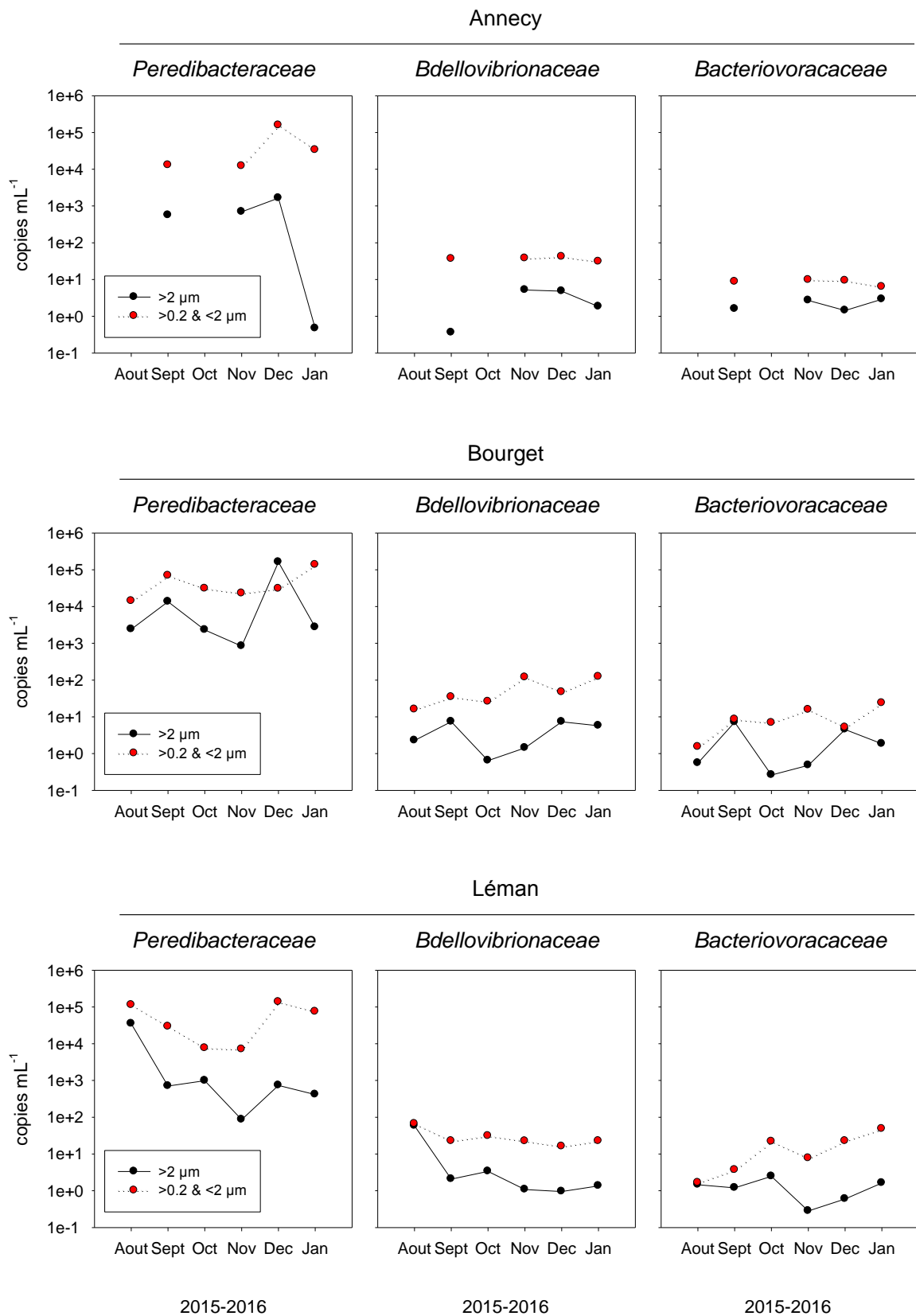
Les différents profils présentés sur la **Figure 8** représentent l'abondance absolue des différentes familles de BALOs (en copies par mL, mesurée par qPCR) en fonction des différents mois de prélèvements pour l'ensemble de la colonne d'eau prélevée, sans discrimination de profondeur. Ces données révèlent tout d'abord que la famille des BALOs la plus représentée dans les trois lacs semble correspondre aux *Peredibacteraceae*, avec une abondance allant jusque  $1,62 \times 10^5$  copies par mL d'eau filtrée. Les *Bdellovibrionaceae* et les *Bacteriovoraceae* ont une abondance absolue en moyenne 10000 fois inférieure à celle des *Peredibacteraceae* avec pour ces deux familles des concentrations maximales atteignant à peine 4 et  $1,25 \times 10^1$  copies par mL d'eau filtrée, respectivement.

On observe aussi une abondance absolue des différents BALOs plus forte pour la fraction « libre » (c'est-à-dire les bactéries récupérées sur les filtres 0,2 µm et après filtration à travers 2 µm) que pour la fraction « attachée » (les bactéries récupérées sur filtres 2 µm).

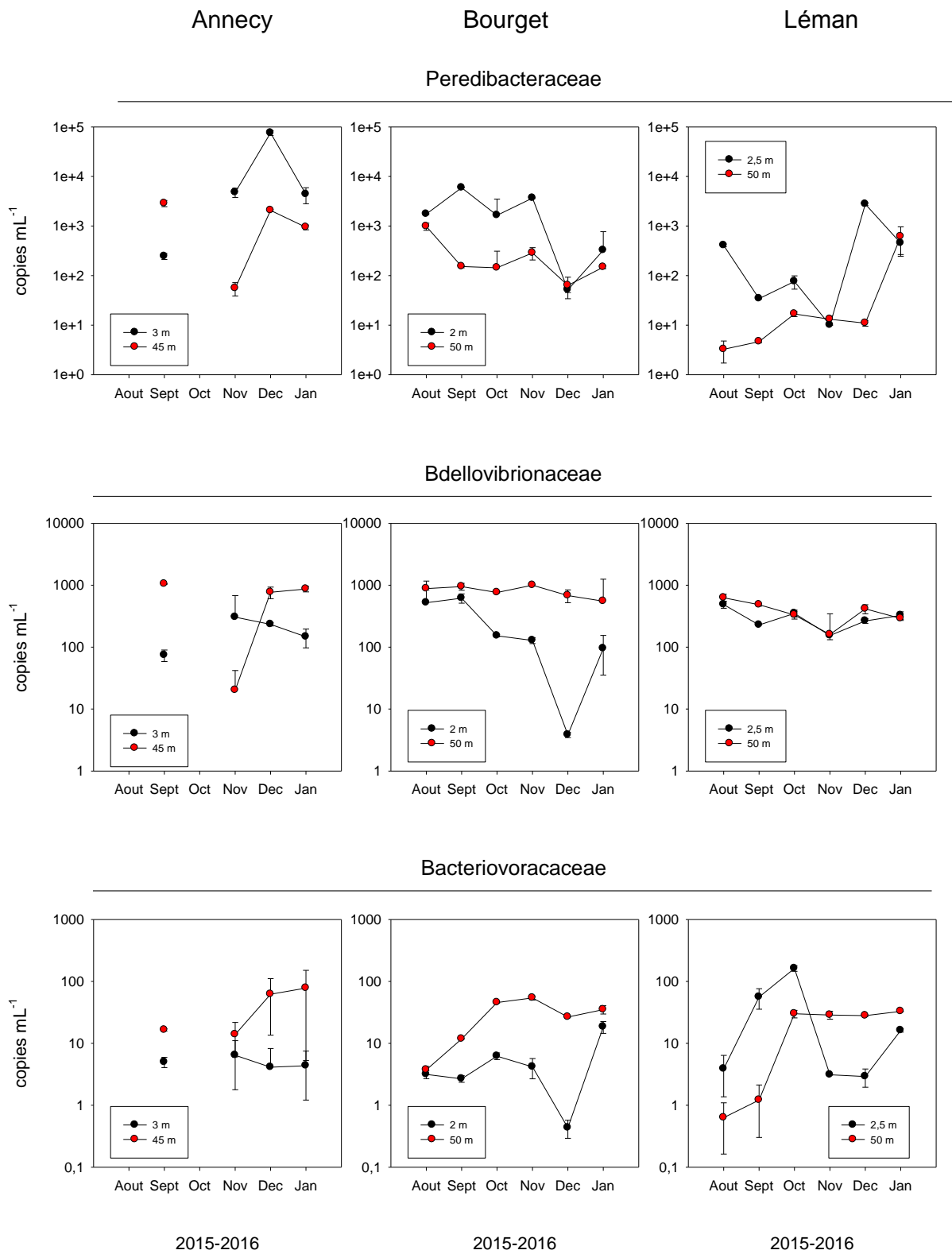
Il ne semble pas y avoir d'effet saisonnier mais ce dernier a peut-être été masqué par le fait que les résultats présentés mixaient l'ensemble des profondeurs.

L'abondance de chaque famille de BALOs a été comparée à celle de l'ensemble des bactéries (totales) également quantifiées par qPCR, pour déterminer le pourcentage relatif de chaque famille de BALOs par rapport à l'ensemble de la communauté bactérienne hétérotrophe. Les résultats détaillés sont présentés en **Annexe**. Globalement, on observe que l'ensemble des *Peredibacteraceae* pouvait représenter jusque 7,12% de l'ensemble des bactéries totales tandis que les *Bacteriovoraceae* et *Bdellovibrionaceae* représentent moins de 0,05% de l'ensemble des bactéries.

Afin d'affiner notre analyse sur la dynamique et la distribution dans la colonne d'eau des différents BALOs, les abondances ont aussi été obtenues en considérant dans un second temps chaque lac à deux profondeurs contrastées (surface [à 2 ; 2,5 ou 3 m suivant les lacs] vs. fond [à 45 ou 50 m suivant les lacs]), pour la fraction libre seulement, et analysées en duplicats (**Fig. 9**). Cette analyse détaillée permet de vérifier tout d'abord que les *Peredibacteraceae*, constituent bien la famille de BALOs la plus abondante (avec 100 à 10000 fois plus de copies par mL que les *Bdellovibrionaceae* et *Bacteriovoraceae*). Par ailleurs, on observe que l'abondance absolue des *Peredibacteraceae* est majoritairement plus forte dans les eaux situées en surface (à 2 ou 3 m de profondeur) que les eaux situées plus en profondeur (à 45 ou 50 m). A l'inverse, on observe que les deux autres familles (*Bdellovibrionaceae* et *Bacteriovoraceae*) sont plus abondantes au fond. Cette constatation est d'autant plus vraie pour le lac du Bourget.



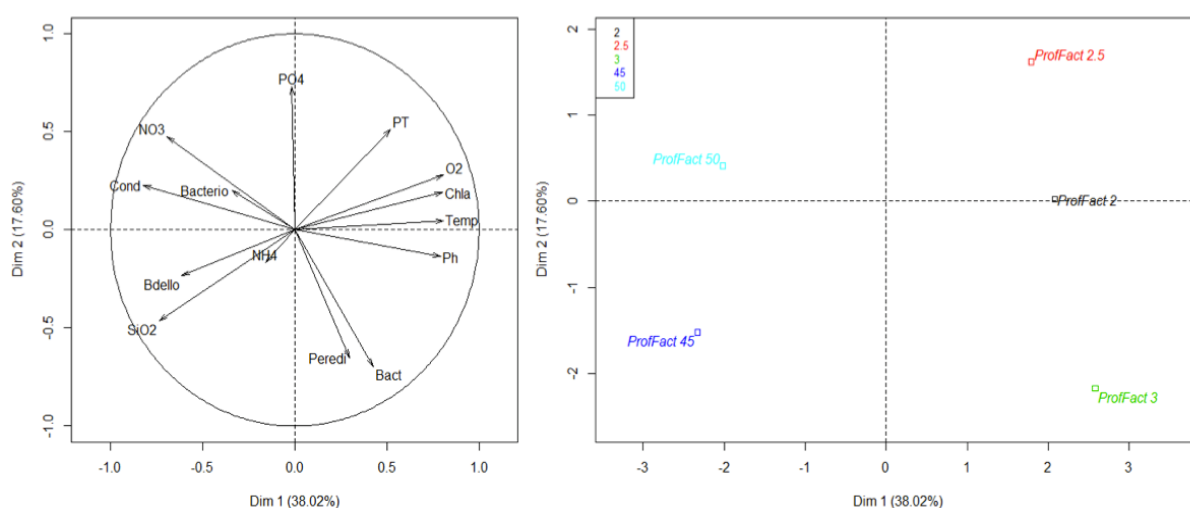
**Figure 8** Dynamique observée dans les 3 lacs pour les différents BALOs quantifiés par qPCR, toute profondeur confondue. L'abondance des différents groupes est mesurée en copies par mL.



**Figure 9** Dynamique observée dans les 3 lacs pour les différents BALOs et les bactéries totales quantifiés par qPCR à deux profondeurs distinguant les eaux de surface de celles plus en profondeur.

## Relations entre l'abondance des BALOs et bactéries totales et de l'ensemble des données environnementales

A partir des abondances obtenues aux deux profondeurs sélectionnées ci-dessus pour chaque BALO, une ACP a été menée avec les données environnementales disponibles dans le cadre du suivi écologique des grands lacs alpins (observatoire OLA : <http://www6.inra.fr/soere-ola/>) afin de mettre en évidence l'existence ou l'absence de liens/relations entre les différentes variables (Fig. 10).



**Figure 10** Représentations graphiques de l'ACP révélant les liens entre les différents paramètres et le poids de la profondeur dans la distribution des différents paramètres.

L'ACP révèle que 55,5% de la variance totale est expliquée. D'après cette analyse, on observe principalement qu'une corrélation positive forte existe entre les bactéries totales et les *Peredibacteraceae* (notées respectivement Bact et Peredi) ( $r=0,74$  ;  $p<0,05$ ), cette relation étant particulièrement marquée pour le lac d'Annecy à 3 m. Comparativement aucune corrélation n'est trouvée entre les différents paramètres et les *Bacteriovoracaceae* (notés Bacterio) quand les *Bdellovibrionaceae* (notés Bdello) montrent eux des liens avec la conductivité ( $r=0,44$  ;  $p<0,05$ ), la concentration en oxygène ( $r=-0,48$  ;  $p<0,05$ ) et la chlorophylle *a* ( $r=0,5$  ;  $p<0,05$ ).

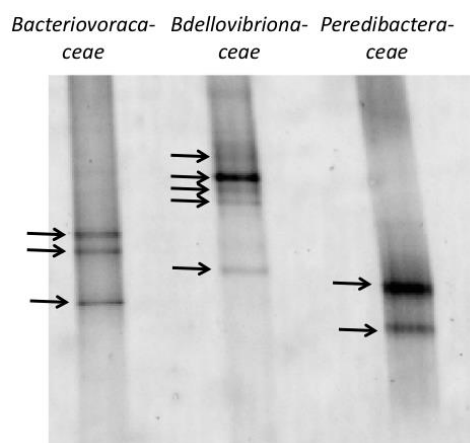
## Structure des différents BALOs révélée par l'analyse DGGE

Le gel proposé ci-contre représente la « diversité » totale observable sur un extrait d'ADN « pool » regroupant l'ensemble des échantillons (Fig. 11). Cette analyse préliminaire a révélé un nombre de bandes restreint pour l'ensemble des trois familles de BALOs étudiées. En effet, le nombre d'empreintes génétiques variait seulement de 1 à 5 bandes majoritaires en fonction des différentes familles étudiées.

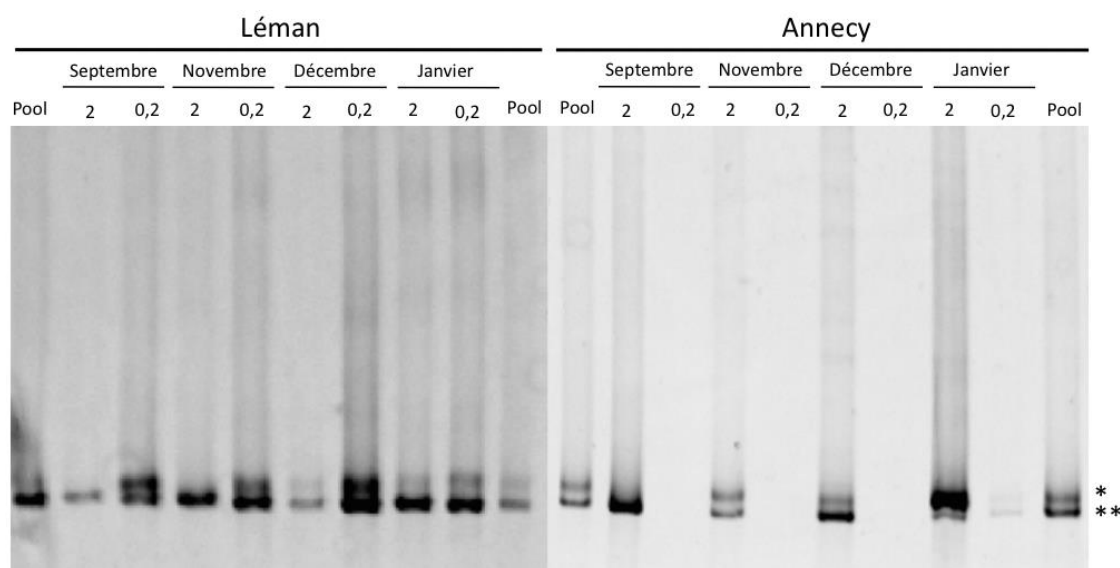
Trois « géotypes » appartenant aux *Bacteriovoraceae* étaient identifiables à partir de trois signaux de même intensité. Un géotype se distinguait majoritairement au sein de la famille des *Bdellovibrionaceae*, suivi de plusieurs géotypes caractérisables par des bandes de plus faible intensité.

Enfin, deux géotypes observables au sein des *Peredibacteraceae* étaient visibles à partir de deux signaux d'intensité différente.

Une étude de la structure de chaque *Peredibacteraceae* et de son évolution dans le temps a été effectuée dans un second temps, confirmant le nombre limité de bandes/géotype se répartissant de la manière suivante : 0 à 1 géotype pour les extraits d'ADN issu de la fraction attachée, et 1 à 2 géotypes (très proches) pour la fraction libre (Fig. 12).



**Figure 11** Photo détaillée d'un gel DGGE effectué à partir d'une amplification PCR sur le « pool » et des différentes amorces ciblant les trois familles de BALOS étudiées. Les flèches indiquent la position des différentes bandes observées.



**Figure 12** Photos détaillées de deux profils de gels DGGE montrant la structure des *Peredibacteraceae*, en fonction du lac, du mois de prélèvement ou du type de fraction (0,2 ou 2 µm). Les deux principaux géotypes observables sont indiqués par les étoiles.

Sur l'ensemble des profils DGGE obtenus on n'observait aucun effet saisonnier visible.

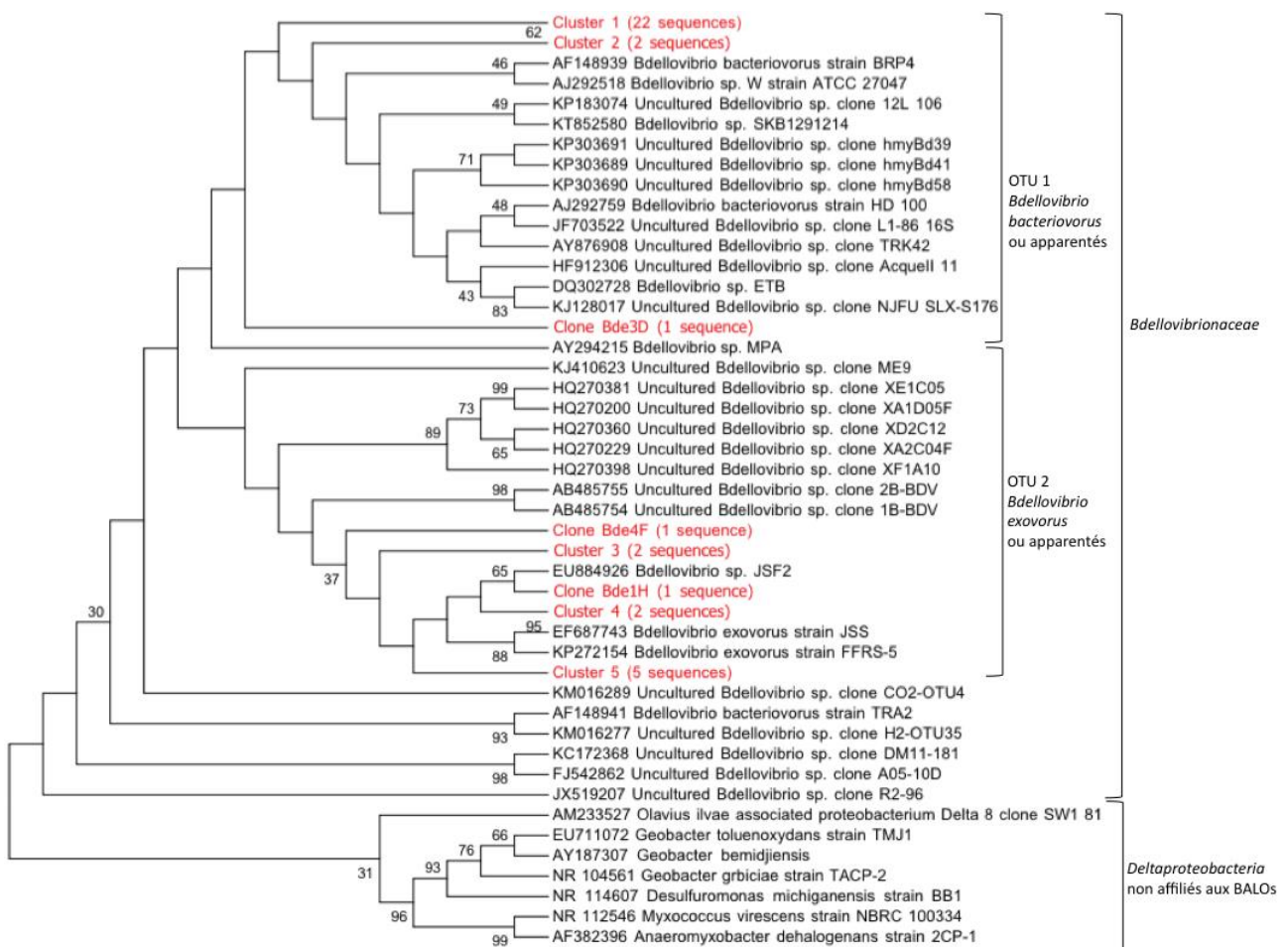
*In fine*, ces résultats laissaient clairement supposer que le nombre de géotypes pour ce type de bactéries au sein de la colonne d'eau des trois lacs étudiés est relativement restreint.

### Diversité des différents BALOs et répartition écologique

Une approche de type clonage-séquençage a été choisie pour apprécier la diversité génétique au sein des différents types de BALOs de manière complémentaire mais aussi plus approfondie que l'analyse DGGE. Les arbres phylogénétiques ont été construits à partir d'un total de 116 séquences codant l'ARN 16S des BALOs obtenues (37 pour les *Peredibacteraceae*, 40 pour les *Bdellovibrionaceae* et 39 pour les *Bacteriovoraceae*).

Nos résultats révèlent clairement que la diversité des BALOs au sein de chaque famille est assez réduite et l'existence de différents clusters caractérisés par des pourcentages de similarités de séquences supérieurs à 99%, au sein de chaque arbre des trois familles.

Le premier arbre phylogénétique, représentatif de la diversité des *Bdellovibrionaceae*, (Fig. 13) permet d'observer la présence de 5 clusters de séquences obtenues avec plus de 99% de similarités. Deux OTUs ont été définis sur cet arbre à partir de 97% de similarité de séquences. Le premier OTU regroupant principalement les séquences du cluster 1 et 2 (25 séquences au total) semble principalement affilié à *Bdellovibrio bacteriovorus*, prédateur périplasmique. Le second OTU regroupant principalement les clusters 3, 4 et 5 (11 séquences au total) semble affilié à *Bdellovibrio exovorus*, prédateur épibiotique.

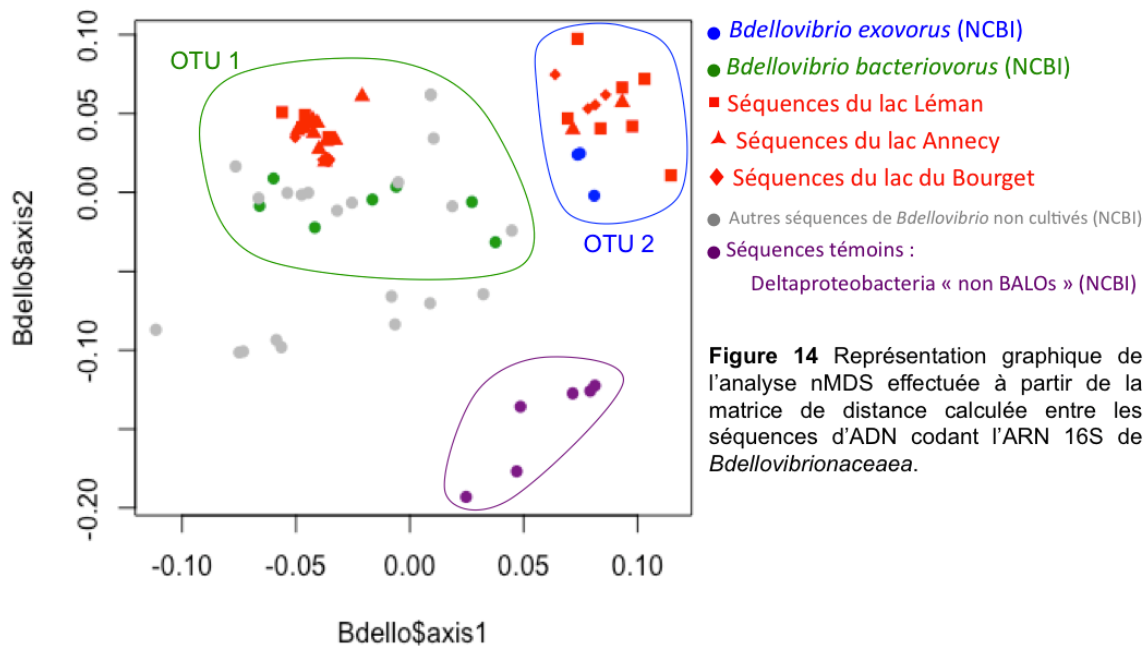


**Figure 13** Arbre phylogénétique des *Deltaproteobacteria* regroupant les séquences d'ADN codant l'ARN 16S des *Bdellovibrionaceae* provenant des données NCBI et de la banque de clones obtenue (séquences annotées en rouge), réalisé par la méthode Neighbor-joining avec 1000 bootstraps répétées.

L'analyse nMDS (Fig. 14) montre alors la répartition des différentes séquences issues de cet arbre en fonction d'une distance calculée par une matrice de dissimilarité. Cette analyse confirme que nos séquences sont regroupées de manière significative au sein de deux OTUs : l'OTU 1 (entouré en vert) affilié principalement aux *Bdellovibrio bacteriovorus* et l'OTU 2 (entouré en rouge) principalement affiliés aux *Bdellovibrio exovorus* ( $r = 0,48$  ;  $p < 0,001$ ). On observe aussi que la diversité observée semble se structurer de manière homogène sans distinction significative en fonction des trois grands lacs alpins (représentés par des triangles,



carrés, losanges bleus,  $p > 0,05$ ). Enfin, on observe que les séquences de *Deltaproteobacteries* n'appartenant pas aux *Bdellovibrionaceae* se clustérisent de manière indépendante au reste des séquences de *Bdellovibrionaceae*.



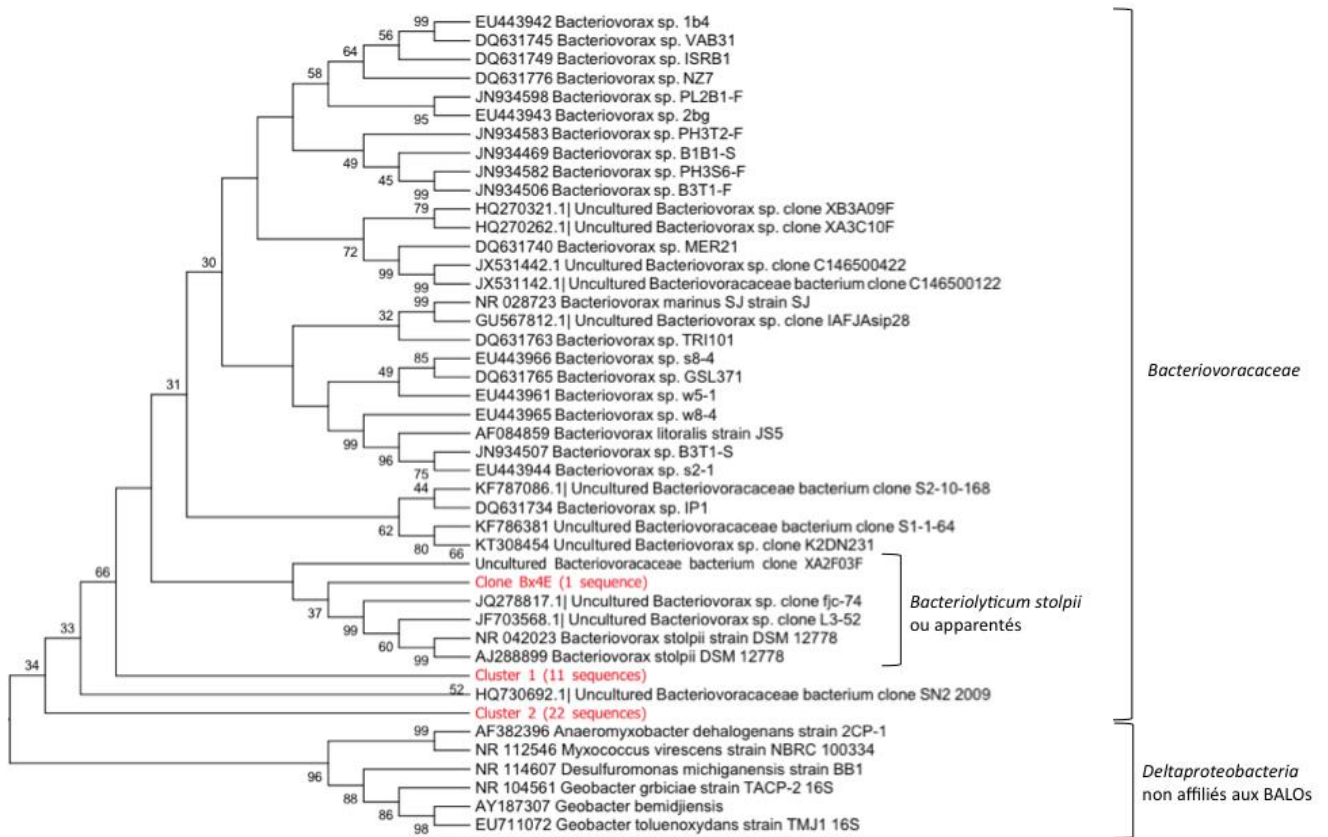
L'arbre phylogénétique représentatif de la diversité des *Bacteriovoraceae* (Fig. 15), permet d'observer une diversité de séquences relativement restreinte avec des clusters regroupés à la base de l'arbre des *Bacteriovoraceae*. Les séquences obtenues se regroupent en différents clusters ne s'affiliant à aucune des séquences de référence choisies sur NCBI qui sont majoritairement d'origine marines, mis à part une séquence du lac Léman qui semble affiliée à *Bacteriolyticum stolpii* (dont la souche type vient d'eau douce). Ce résultat suggère que les séquences de *Bacteriovoraceae* obtenues dans le cadre de notre étude sont encore majoritairement non affiliées et donc inconnues à ce jour.

L'analyse nMDS (Fig. 16) basée sur la distance phylogénétique entre chaque séquence conforte ce résultat montrant que les séquences d'origine marine et d'origine lacustre constituent des clusters distincts. De manière similaire à l'analyse phylogénétique, l'analyse nMDS montre que les séquences obtenues se regroupent de manière significative en différents clusters distincts entourés en rouge ( $r = 0,63$  ;  $p < 0,001$ ). Ces différents clusters semblent correspondre aux différents clusters observés au niveau de l'arbre phylogénétique. Par ailleurs aucune distinction concernant la répartition des séquences des différents clusters en fonction des lacs n'est observable ni significative ( $p > 0,05$ ).

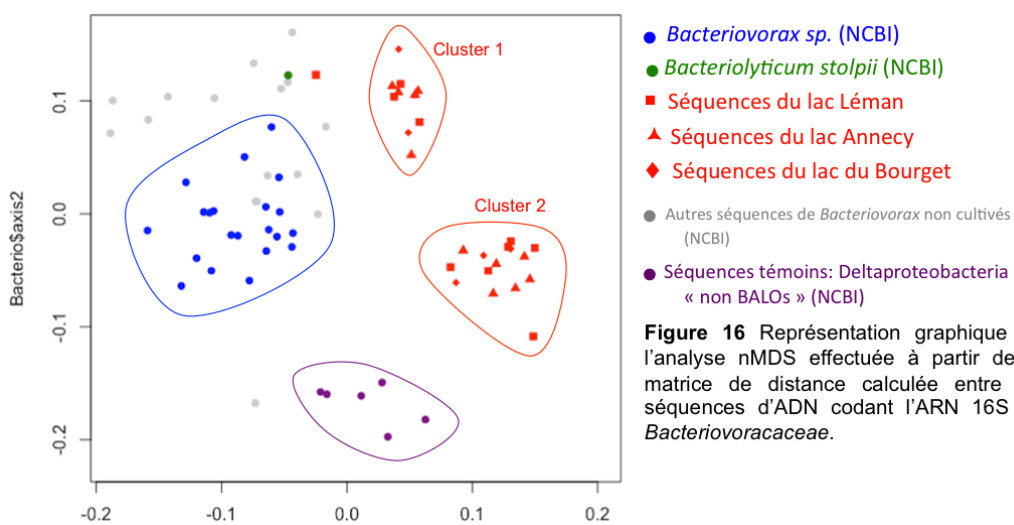
Enfin, l'arbre phylogénétique représentatif de la diversité des *Peredibacteraceae* (Fig. 17) montre dans un dernier temps que les séquences obtenues sont très proches taxonomiquement avec une similarité de 99% entre les séquences et sont affiliées à *Peredibacter starrii*, avec une similarité de séquence supérieure à 97%, dont la souche représentative (*Peredibacter starrii* A3.12) a été isolée en eau douce (Pineiro *et al.*, 2008). A l'inverse, aucune séquence ne se retrouve directement affilié à *Bacteriolyticum stolpii*, dont la souche a aussi été isolée en eau douce (Pineiro *et al.*, 2008).

Ces résultats sont confortés par l'analyse nMDS (Fig. 18) montrant la répartition taxonomique significative des séquences préférentiellement affiliées à *Peredibacter starrii*. ( $r =$

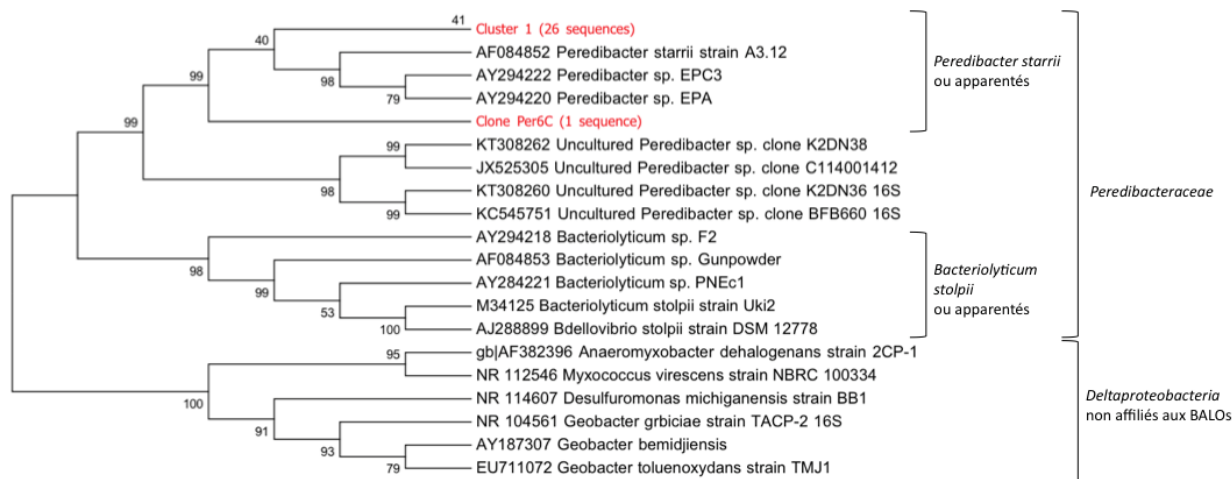
0,57 ;  $p < 0,001$ ). Tout comme les deux précédentes familles, aucune distinction n'est clairement visible, ni significative concernant la répartition taxonomique des séquences obtenues en fonction des lacs ( $p < 0,05$ ).



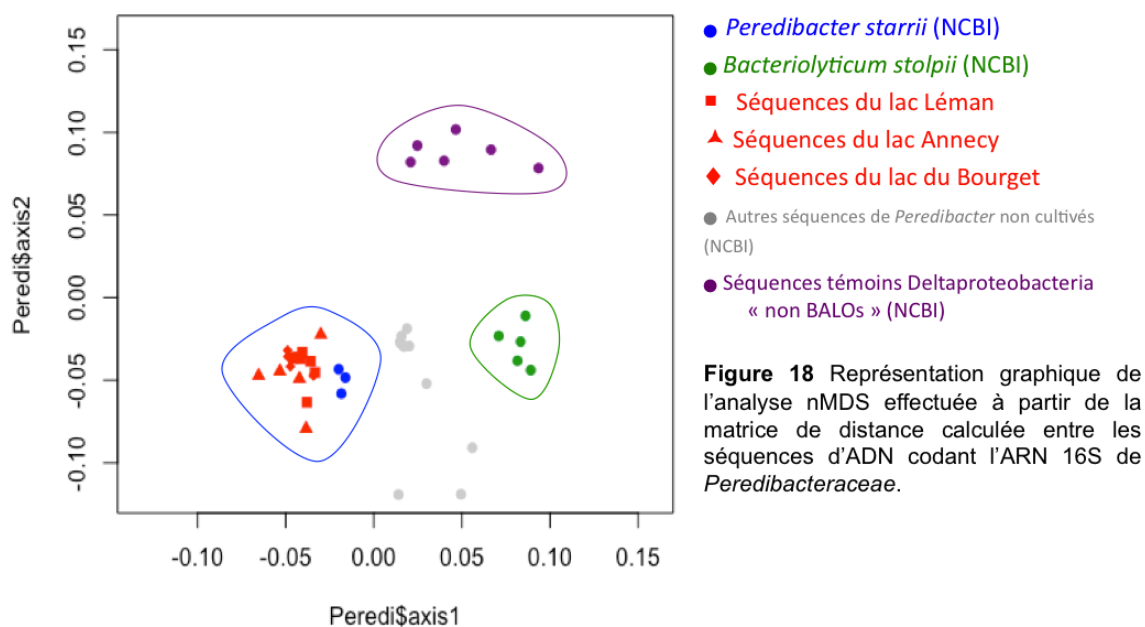
**Figure 15** Arbres phylogénétiques des *Deltaproteobacteria* regroupant les séquences d'ADN codant l'ARN 16S des *Bacteriovoraceae* provenant des données NCBI et de la banque de clones obtenue (séquences annotées en rouge), réalisé par la méthode Neighbor-joining avec 1000 bootstraps répétées.



**Figure 16** Représentation graphique de l'analyse nMDS effectuée à partir de la matrice de distance calculée entre les séquences d'ADN codant l'ARN 16S de *Bacteriovoraceae*.



**Figure 17** Arbres phylogénétiques des *Deltaproteobacteria* regroupant les séquences d'ADN codant l'ARN 16S des *Peredibacteraceae* provenant des données NCBI et de la banque de clones obtenue (séquences annotées en rouge), réalisé par la méthode Neighbor-joining avec 1000 bootstraps répétées



**Figure 18** Représentation graphique de l'analyse nMDS effectuée à partir de la matrice de distance calculée entre les séquences d'ADN codant l'ARN 16S de *Peredibacteraceae*.

## Discussion

### *Les BALOs sont bien présents dans les grands lacs péri-alpins*

Premier résultat majeur de notre étude, la révélation pour la première fois de l'existence de bactéries prédatrices de bactéries au sein des trois grands lacs péri-alpins français que sont les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget. La présence et l'importance des BALOs n'ayant jamais été spécifiquement étudiées dans ces lacs, différentes méthodes de biologie moléculaire ont été testées et optimisées afin d'apprécier leur diversité et leur abondance. Nous avons aussi dessiné de nouveaux primers qPCR spécifiques des *Peredibacteraceae*, car aucune amorce n'existait pour cette famille de BALOs d'eau douce récemment découverte. Au final, cette étude aura permis de quantifier et d'analyser la diversité de trois groupes représentatifs des BALOs, au sein des grands lacs péri-alpins : les *Peredibacteraceae*, les *Bdellovibrionaceae* et les *Bacteriovoracaceae*, et de confronter ces résultats à ceux obtenus pour d'autres environnements. Distinguer la fraction libre de la fraction attachée, révélant pour la première qu'abondance et diversité observée par DGGE y sont plus élevées, a aussi constitué une originalité importante de cette étude. Ce résultat semble cohérent avec les données issues de la littérature et le cycle de vie de ces bactéries qui nécessite une phase libre dite de « free-swimming » pour rechercher de nouvelles proies (Rotem *et al.*, 2014 ; Sockett *et al.*, 2009).

### *Biais et limites*

Si notre étude a donc clairement mis en lumière l'existence et l'importance globale et relative de BALOs dans les grands lacs péri-alpins, elle reste limitée par le choix des méthodes utilisées ou encore du nombre restreint d'échantillons analysés. En effet, il faut garder en mémoire que nous n'avons travaillé que sur quelques profondeurs pendant quelques mois si bien que notre image de la distribution et de la dynamique de cette communauté reste forcément limitée. Cela pourrait expliquer en partie la raison pour laquelle nous n'avons pas pu révéler clairement de facteurs clés intervenant sur l'abondance ou la diversité de ces prédateurs. Concernant l'analyse génétique, nous n'avons trouvé qu'une diversité assez limitée. Il est possible que les amorces utilisées n'aient été capables que d'amplifier une partie de la diversité au sein de chaque famille, et ce, de manière différente entre les différents groupes. De plus, nous sommes conscients des limites associées au séquençage classique (de type SANGER) effectué sur des produits PCR issus de clones (en nombre restreint) construits sur la base de l'extraction d'ADN de bandes DGGE s'étant avéré de plus en quantité très faible. Là encore, nos résultats ont donc pu être limités et il n'est donc pas exclu que la diversité des BALOs soit en fait beaucoup plus élevée.

### *Diversité et abondance des Peredibacteraceae*

En gardant en mémoire les biais possibles énumérés plus haut, nous avons trouvé que les *Peredibacteraceae* se sont révélées être très peu diversifiées malgré une abondance relativement élevée. L'ensemble des séquences obtenues sont très proches et regroupées au sein d'un même cluster affilié à l'espèce *Peredibacter starrii*, qui constitue le principal représentant de cette famille, et qui est communément retrouvé en eau douce (Davidov *et al.*, 2004). Aucune séquence obtenue ne s'affilie avec *Bactriolyticum stolpii*, dont l'appartenance aux *Bacteriovoracaceae* ou au *Peredibacteraceae* reste encore ambiguë.

Les *Peredibacteraceae*, dont les souches décrites dans la littérature ont été isolées à partir d'eau douce (Pineiro *et al.*, 2008), constituent la famille la plus abondante pour l'ensemble des

conditions étudiées (au sein des trois lacs, des différentes profondeurs, des différentes fractions et des différentes périodes de prélèvement). Leur abondance est estimée entre 100 à 10000 fois supérieure à celle des *Bdellovibrionaceae* et des *Bacteriovoracaceae*, dont les souches décrites sont quant à elles principalement isolées des milieux marins. Ce premier résultat laisse supposer que l'abondance des BALOs dans les grands lacs péri-alpins est fortement liée à la très faible salinité. Une absence de sel dans le milieu favoriserait alors le développement de BALOs adaptés au milieu d'eau douce tel que *Peredibacter starii* et serait lié à une faible abondance des bactéries adaptés aux milieux marins tel que *Bacteriovorax sp.*

L'abondance relative de ces prédateurs par rapport à l'ensemble des bactéries hétérotrophes montre que les *Peredibacteraceae* peuvent représenter jusqu'à 7,12 % de la communauté des bactéries hétérotrophes. En comparaison avec d'autres prédateurs bactériens, l'abondance des *Peredibacteraceae*, semble se distribuer de manière cohérente entre celle des prédateurs flagellés eucaryotes (présents entre 300 et 1200 cellules par mL dans le lac d'Annecy ; Domaizon *et al.*, 2003), et celle des virus bactériophages (présents entre  $4.10^7$  à  $10^8$  particules virales par mL dans le lac du Bourget ; Jacquet *et al.*, 2005). Cette proportion nous indique que les *Peredibacteraceae* pourraient donc jouer de par leur abondance relative, un rôle non négligeable sur la dynamique de leur proie. Ce résultat est appuyé par l'ACP qui montre que l'abondance totale des bactéries hétérotrophes est étroitement liée avec celle des *Peredibacteraceae*, et qui pourrait suggérer ce lien proie-prédateur. De par l'abondance relative des *Peredibacteraceae*, les relations de type proie-prédateur pourraient donc exercer un rôle fonctionnel important au sein des grands lacs péri-alpins (agents de mortalité cellulaire, redistribution et de la matière, flux). Par ailleurs, l'étude de la dynamique des *Peredibacteraceae* entre deux profondeurs distinctes, l'une en surface et l'une plus en profondeur, montre que ces prédateurs bactériens occupent une niche écologique majoritairement située en surface contrairement aux deux autres familles principalement situées en profondeur.

#### *Abondances et diversité des Bdellovibrionaceae et des Bacteriovoracaceae*

Les *Bdellovibrionaceae* et *Bacteriovoracaceae* diffèrent donc majoritairement des *Peredibacteraceae* de par leur abondance beaucoup plus faible, mais aussi de par leur niche écologique qui semble située plus en profondeur.

Les faibles concentrations de *Bdellovibrionaceae* et de *Bacteriovoracaceae*, (atteignant au maximum 125 copies par mL), sont d'autant plus notables lorsqu'on les compare à d'autres études. L'étude de l'abondance des *Bdellovibrionaceae* et des *Bacteriovoracaceae* dans les systèmes d'aquacultures établit des concentrations mesurées situées entre  $10^3$  et  $10^6$  cellules par mL (Kandel *et al.*, 2014). Ces résultats laissent donc clairement supposer que ces deux familles jouent un impact plus limité sur la communauté des bactéries hétérotrophes au sein des grands lacs péri-alpins, même si de récentes études ont montré qu'une faible abondance de BALOs n'est pas forcément directement corrélée avec un plus faible impact fonctionnel sur la dynamique de leurs proies (Richards *et al.*, 2012 ; Williams *et al.*, 2016 ; Welsh *et al.*, 2016). En clair, malgré les très faibles abondances de *Bdellovibrionaceae* et de *Bacteriovoracaceae*, leur rôle fonctionnel n'est pas forcément négligeable et constitue malgré tout une possibilité à prendre en compte.

L'analyse phylogénétique des *Bdellovibrionaceae* nous a montré que les séquences obtenues se regroupent au sein de deux OTU distincts, l'un affilié à *Bdellovibrio bacteriovorus* et le second affilié à *B. exovorus*. Ces deux groupes distincts diffèrent non seulement de par leurs génotypes mais aussi de par leur comportement trophique et leur phénotype. En effet, les *B.*

*bacteriovorus* sont des prédateurs périplasmiques dont la stratégie de prédation consiste à pénétrer dans l'espace périplasmique de la bactérie proie, tandis que les *B. exovorus* sont des prédateurs épibiotiques, se fixant sur la proie sans y pénétrer. Aucun des critères écologiques étudiés (période de prélèvement, fraction, profondeur ou le type de lac) ne permet de différencier une diversité préférentielle pour l'un des deux types de prédation. La présence de ces deux types de prédation au sein de l'ensemble des conditions étudiées pour chaque lac suggère que d'autres paramètres écologiques encore non étudiées pourraient permettre de distinguer une diversité préférentielle pour l'un des deux types de prédation.

Enfin, les *Bacteriovoraceae* trouvées dans les grands lacs péri-alpins ne sont affiliées à aucune des séquences issues de la base de données NCBI provenant d'échantillons environnementaux d'origine marine ou de souche isolées à partir d'un milieu marin. Parmi l'ensemble des 33 séquences obtenues une seule s'affilie à une souche d'eau douce connue : *Bacteriolyticum stolpii*. Ce résultat suggère qu'il existe une diversité de *Bacteriovoraceae* pouvant être spécifique aux milieux d'eau douce et dont la plupart n'a encore jamais été étudiée. Nos résultats s'opposent donc à l'idée que les *Bacteriovoraceae* constituent une famille spécifique du milieu marin pouvant/devant être reclassifiée en tant que *Halobacteriovoraceae*.

#### *Conclusion et perspectives*

En conclusion, les résultats obtenus ont révélé pour la première fois la présence de prédateurs bactériens appartenant à trois principales familles de BALOs dans trois grands lacs péri-alpins. Ces résultats discutés ci-dessus amènent à conclure que ces bactéries jouent sans nul doute un rôle non négligeable dans le fonctionnement de ces écosystèmes mais que ce rôle reste entièrement à appréhender, notamment pour les *Peredibacteraceae*, de par leur abondance majoritaire mais aussi pour les *Bdellovibrionaceae* et les *Bacteriovoraceae* de par leur diversité. Une perspective évidente à nos travaux est donc de pouvoir apprécier finement les interactions entre hôte et prédateurs au travers d'approches qui pourraient être de type NGS (pour apprécier aussi plus finement la diversité) à partir d'amorces spécifiques de chaque famille de BALOs (réseaux d'interactions) et/ou expérimentales à partir d'isolements. Une approche expérimentale à partir d'isolements de différentes souches représentatives des familles de BALOs, basé sur les travaux effectués par E. Jurkevitch et son équipe, permettrait de mettre en co-culture ces bactéries dans des microcosmes, avec leurs proies afin de connaître l'influence des différents paramètres du milieu sur la relation proie-prédateur. Des expériences en microcosmes pourraient par exemple être imaginées, dans différentes conditions, en suivant l'approche expérimentale proposée par Williams *et al.* (2016) permettant l'énumération de BALOs par qPCR et par une approche de type SIP suite à l'ajout de proies radiomarquées dans différents microcosmes. L'énumération et l'analyse de la diversité des différents BALOs en microcosmes permettrait ainsi de corrélérer de manière directe les différents paramètres environnementaux caractéristiques du milieu lacustres (tel la quantité de proies, la diversité des proies, le types d'éléments nutritifs, etc ...) avec la répartition des différents BALOs. A ces différentes perspectives proposées pour l'étude du rôle fonctionnel des BALOs au sein de la colonne d'eau, l'importance de l'abondance, la structure et la diversité des BALOs au sein d'autres matrices, tel que les biofilms et les sédiments au sein du milieu lacustre peri-alpin constituent un autre enjeu intéressant. Cela supposerait de refaire un examen précis des couples d'amorces et peut-être d'en dessiner de nouvelles. D'autres questions restent aussi en suspens, notamment quant à la diversité, l'importance quantitative et fonctionnelle d'une famille de BALOs non étudiée au

cours du stage : les *Micavibrio*. Si l'identification de nouvelles espèces voir de familles de BALOs reste largement inconnue au sein des grands lacs, les données sur les milieux marins, côtiers ou océaniques, sont aussi très fragmentaires, si bien qu'un projet visant à comparer ces différents types d'écosystèmes serait aussi une perspective intéressante.

## Références bibliographiques

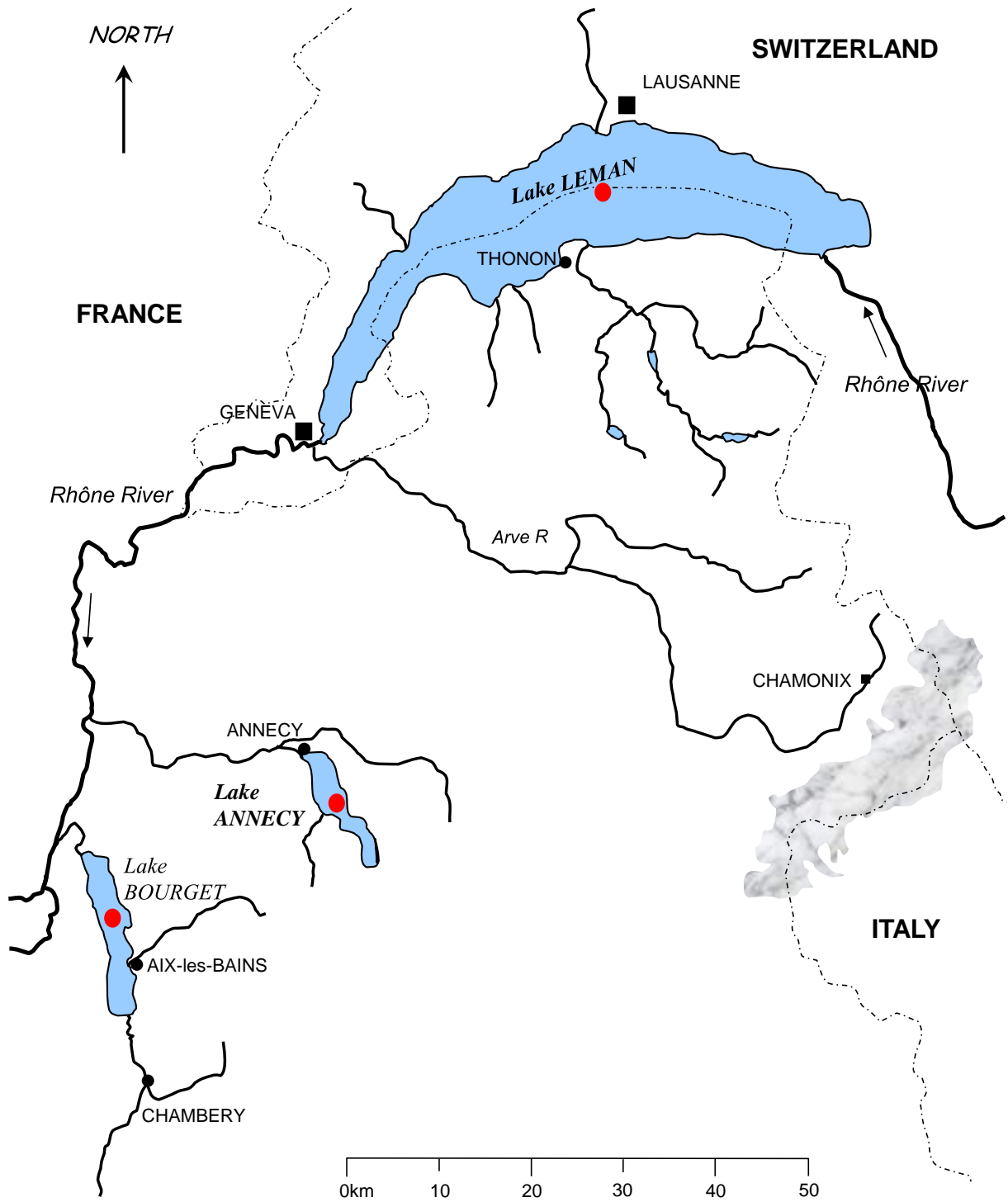
- Baer ML, Ravel J, Piñeiro SA, *et al.* (2004). Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1011–1016.
- Berdjeb L, Pollet T, Domaizon I, *et al.* (2011). Effect of grazers and viruses on bacterial community structure and production in two contrasting trophic lakes. *BMC Microbiol* **11**: 88.
- Brentlinger KL, Hafenstein S, Novak CR, *et al.* (2002). *Microviridae*, a family divided: isolation, characterization, and genome sequence of phiMH2K, a bacteriophage of the obligate intracellular parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* **184**: 1089–1094.
- Comte J, Jacquet S, Viboud S, *et al.* (2006). Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget). *Microb Ecol* **52**: 72–89.
- Davidov Y, Friedjung A, Jurkevitch E. (2006). Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms. *Environmental Microbiology* **8**: 1667–1673.
- Davidov Y, Jurkevitch E. (2004). Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax-Peredibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1439–1452.
- Debroas D, Humbert J-F, Enault F, *et al.* (2009). Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget--France). *Environ Microbiol* **11**: 2412–2424.
- Domaizon I, Viboud S, Fontvieille D. (2003). Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy—importance of mixotrophy. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 317–329.
- Domaizon I, Savichtcheva O., Debroas D., Arnaud F., Villar C., Pignol C., Alric B., Perga M.E. (2013) DNA lake sediments reveals the long-term dynamics and diversity of *Synechococcus* assemblages. *Biogeosciences* **10**: 3817–3838.
- Evans KJ, Lambert C, Sockett RE. (2007). Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 requires type IV pili. *J Bacteriol* **189**: 4850–4859.
- Fenton AK, Kanna M, Woods RD, *et al.* (2010). Shadowing the actions of a predator: backlit fluorescent microscopy reveals synchronous nonbinary septation of predatory *Bdellovibrio* inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *J Bacteriol* **192**: 6329–6335.
- Jacquet S, Domaizon I, Anneville O. (2014). The need for ecological monitoring of freshwaters in a changing world: a case study of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva. *Environ Monit Assess* **186**: 3455–3476.
- Jacquet S, Domaizon I, Personnic S, Duhamel S, Pradeep Ram AS, Haldal M, Sime-Ngando T. (2005). Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshwater Biol* **50**: 627–645.
- Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, *et al.* (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2365–2371.
- Koval SF, Hynes SH, Flannagan RS, *et al.* (2013). *Bdellovibrio exovorax* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 146–151.
- Pineiro SA, Stine OC, Chauhan A, *et al.* (2007). Global survey of diversity among environmental saltwater *Bacteriovoracaceae*. *Environ Microbiol* **9**: 2441–2450.
- Piñeiro SA, Williams HN, Stine OC (2008). Phylogenetic relationships amongst the saltwater members of the genus *Bacteriovorax* using rpoB sequences and reclassification of *Bacteriovorax stolpii* as *Bacteriolyticum stolpii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1203–1209.



- Pérez J, Moraleda-Muñoz A, Marcos-Torres FJ, *et al.* (2016). Bacterial predation: 75 years and counting! *Environ Microbiol* **18**:766–79.
- Personnic, S., Domaizon I, Sime-Ngando T, Jacquet S. (2009). Seasonal variations of microbial abundances and of virus- vs. flagellate-induced mortality of picoplankton in some peri-alpine lakes. *J. Plank. Res.* **31**: 1161-1177.
- Personnic, S., Domaizon I, Dorigo U, Berdjeb B, Jacquet S. (2009). Seasonal and spatial variability of virio, bacterio- and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiol.* **627**: 99-111.
- Rotem O, Pasternak Z, Jurkevitch E. (2014). The Genus *Bdellovibrio* and Like Organisms. *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* 3–17.
- Rotem O, Pasternak Z, Shimoni E, *et al.* (2015). Cell-cycle progress in obligate predatory bacteria is dependent upon sequential sensing of prey recognition and prey quality Cues. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 6028–6037.
- Richards GP, Fay JP, Dickens KA, *et al.* (2012). Predatory bacteria as natural modulators of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seawater and oysters. *Appl Environ Microbiol* **78**:7455–66.
- Roux S, Enault F, Robin A, *et al.* (2012). Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics. *PLoS ONE* **7**: e33641.
- Sime-Ngando, T., J. Colombet, S. Personnic, I. Domaizon, U. Dorigo, P. Perney, J.-C. Hustache, E. Viollier and S. Jacquet. (2008). Short-term variations in abundances and potential activities of viruses, bacteria and nanoprotoists in Lake Bourget. *Ecol. Res.* **23**:851-861.
- Sockett RE (2009). Predatory lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annu Rev Microbiol* **63**: 523–539.
- Welsh RM, Zaneveld JR, Rosales SM, *et al* (2016). Bacterial predation in a marine host-associated microbiome. *ISME J* **10**:1540–4.
- Williams HN, Lymperopoulou DS, Athar R, *et al.* (2016). Halobacteriovorax, an underestimated predator on bacteria : potential impact relative to viruses on bacterial mortality. *ISME J* 2016 **10**:491–9.
- Zhong X, Guidoni B, Jacas L, *et al.* (2015). Structure and diversity of ssDNA *Microviridae* viruses in two peri-alpine lakes (Annecy and Bourget, France). *Res Microbiol* **166**: 644–654.
- Zhong X, Jacquet S (2014). Contrasting diversity of phycodnavirus signature genes in two large and deep western European lakes. *Environ Microbiol* **16**: 759–773.

### Annexe 1

Localisation géographique des différents sites d'échantillonnages en rouge



## Annexe 2

Récapitulatif de l'ensemble des échantillons prélevés et extraits

N° tube	Lac	Profondeur (m)	Fraction	Date de prélèvement	Dosage (ng/uL)	N° tube	Lac	Profondeur (m)	Fraction	Date de prélèvement	Dosage (ng/uL)
1	Annecy	3	0,2	15/09/15	35,32	61	Bourget	50	0,2	10/11/15	28,99
2	Annecy	15	0,2	15/09/15	41,42	62	Bourget	110	0,2	10/11/15	30,65
3	Annecy	45	0,2	15/09/15	58,5	63	Bourget	2	2	10/11/15	137,57
4	Annecy	3	2	15/09/15	45,96	64	Bourget	15	2	10/11/15	181,04
5	Annecy	15	2	15/09/15	60,93	65	Bourget	50	2	10/11/15	150,4
6	Annecy	45	2	15/09/15	28,65	66	Bourget	110	2	10/11/15	30,3
7	Annecy	3	0,2	17/11/15	143,58	67	Léman	2	0,2	06/10/15	79,07
8	Annecy	15	0,2	17/11/15	135,5	68	Léman	15	0,2	06/10/15	100,16
9	Annecy	45	0,2	17/11/15	56,69	69	Léman	50	0,2	06/10/15	35,84
10	Annecy	3	2	17/11/15	107,53	70	Léman	110	0,2	06/10/15	21,31
11	Annecy	15	2	17/11/15	118,47	71	Léman	2	2	06/10/15	171,9
12	Annecy	45	2	17/11/15	84,51	72	Léman	15	2	06/10/15	95,33
13	Annecy	3	0,2	09/12/15	369	73	Léman	50	2	06/10/15	12,71
14	Annecy	15	0,2	09/12/15	111,67	74	Léman	110	2	06/10/15	6,08
15	Annecy	45	0,2	09/12/15	52,29	75	Léman	2	0,2	16/11/15	170,14
16	Annecy	3	2	09/12/15	94,17	76	Léman	15	0,2	16/11/15	190,39
17	Annecy	15	2	09/12/15	68,97	77	Léman	50	0,2	16/11/15	51,72
18	Annecy	45	2	09/12/15	125,73	78	Léman	110	0,2	16/11/15	17,27
19	Bourget	2	0,2	25/08/15	54,39	79	Léman	2	2	16/11/15	174,03
20	Bourget	15	0,2	25/08/15	48,81	80	Léman	15	2	16/11/15	112,54
21	Bourget	50	0,2	25/08/15	31,08	81	Léman	50	2	16/11/15	31,13
22	Bourget	110	0,2	25/08/15	14,01	82	Léman	110	2	16/11/15	8,61
23	Bourget	2	2	25/08/15	114,99	83	Léman	2	0,2	17/12/15	161,52
24	Bourget	15	2	25/08/15	101,27	84	Léman	15	0,2	17/12/15	204
25	Bourget	50	2	25/08/15	26,74	85	Léman	50	0,2	17/12/15	41,61
26	Bourget	110	2	25/08/15	14,42	86	Léman	110	0,2	17/12/15	14,94
27	Bourget	2	0,2	21/09/15	81,68	87	Léman	2	2	17/12/15	144,02
28	Bourget	15	0,2	21/09/15	128,13	88	Léman	15	2	17/12/15	138,78
29	Bourget	50	0,2	21/09/15	31,91	89	Léman	50	2	17/12/15	14,29
30	Bourget	110	0,2	21/09/15	39,37	90	Léman	110	2	17/12/15	12,57
31	Bourget	2	2	21/09/15	157,59	91	Léman	2	0,2	20/01/16	106,75
32	Bourget	15	2	21/09/15	200,38	92	Léman	15	0,2	20/01/16	117,48
33	Bourget	50	2	21/09/15	102,07	93	Léman	50	0,2	20/01/16	44,26
34	Bourget	110	2	21/09/15	27,58	94	Léman	110	0,2	20/01/16	57,32
35	Léman	2	0,2	18/08/15	33,89	95	Léman	2	2	20/01/16	113,96
36	Léman	15	0,2	18/08/15	41,81	96	Léman	15	2	20/01/16	113,2
37	Léman	50	0,2	18/08/15	9,95	97	Léman	50	2	20/01/16	69,83
38	Léman	110	0,2	18/08/15	14,38	98	Léman	110	2	20/01/16	28,44
39	Léman	2	2	18/08/15	55,88	99	Bourget	2	0,2	14/12/15	119,41
40	Léman	15	2	18/08/15	35,57	100	Bourget	15	0,2	14/12/15	71,6
41	Léman	50	2	18/08/15	20,2	101	Bourget	50	0,2	14/12/15	50,36
42	Léman	110	2	18/08/15	7,37	102	Bourget	110	0,2	14/12/15	45,44
43	Léman	2	0,2	26/10/15	175,96	103	Bourget	2	2	14/12/15	240,18
44	Léman	15	0,2	26/10/15	77,14	104	Bourget	15	2	14/12/15	146,07
45	Léman	50	0,2	26/10/15	27,51	105	Bourget	50	2	14/12/15	45,84
46	Léman	110	0,2	26/10/15	26,95	106	Bourget	110	2	14/12/15	23,48
47	Léman	2	2	26/10/15	126,1	107	Bourget	2	0,2	18/01/16	57,98
48	Léman	15	2	26/10/15	72,58	108	Bourget	15	0,2	18/01/16	266,08
49	Léman	50	2	26/10/15	11,57	109	Bourget	50	0,2	18/01/16	67,87
50	Léman	110	2	26/10/15	5,21	110	Bourget	110	0,2	18/01/16	46,67
51	Bourget	2	0,2	27/10/15	351,82	111	Bourget	2	2	18/01/16	59,88
52	Bourget	15	0,2	27/10/15	181,53	112	Bourget	15	2	18/01/16	42,56
53	Bourget	50	0,2	27/10/15	47,23	113	Bourget	50	2	18/01/16	54,48
54	Bourget	110	0,2	27/10/15	28,14	114	Bourget	110	2	18/01/16	64,5
55	Bourget	2	2	27/10/15	180,46	115	Annecy	3	0,2	26/01/16	123,19
56	Bourget	15	2	27/10/15	253,71	116	Annecy	15	0,2	26/01/16	91,46
57	Bourget	50	2	27/10/15	106,64	117	Annecy	45	0,2	26/01/16	59,61
58	Bourget	110	2	27/10/15	13,76	118	Annecy	3	2	26/01/16	62,44
59	Bourget	2	0,2	10/11/15	217,47	119	Annecy	15	2	26/01/16	61,04
60	Bourget	15	0,2	10/11/15	263,33	120	Annecy	45	2	26/01/16	37,36

### Annexe 3 :

Approche détaillée pour le dessin des amorces

#### Sur NCBI/Primer-Blast : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Pour le « PCR Template » importer la séquence partielle de l'ADN codant l'ARN 16S de la souche *Peredibacter starri* A3.12 disponible sur GenBank

Sélectionner les paramètres de spécificité des amorces suivants :

- Specificity check 3
- Search mode : Automatic
- Database : Genome (chromosomes from all organisms)
- Organism : Bacteria (taxid:2)
- Primer specificity stringency : Primer must have at least 3 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 6 bps at the 3' end. Ignore targets that have 7 or more mismatches to the primer.
- Max target size : 350

NCBI-primer blast propose alors une liste de couple d'amorces qui seront ensuite testés in silico afin de sélectionner les couples les plus spécifiques.

Repérer les températures de demi-dénaturation ( $T_m$ ) de chaque amorces (forward et reverse) au sein d'un même couple et ne conserver que les couples qui ont un  $T_m$  identiques.

Blaster dans un premier temps, chacune des amorces une par une avec un Blastn. Ne conserver que les couples de primers dont les séquences correspondent au *Peredibacteraceae* (séquences issue d'espèces cultivés ou non).

Réaliser ensuite un Primer Blast avec les amorces sélectionnées en suivant les mêmes paramètres que ceux utilisées pour leurs mises aux points. Ne conserver que les amorces ciblant les *Peredibacteraceae* (séquences issue d'espèces cultivés ou non).

#### Sur le logiciel Fast PCR : <http://primerdigital.com/fastpcr.html>

Réaliser ensuite une PCR in silico pour s'assurer qu'il n'y a pas de formation de dimères entre les amorces : importer les couples d'amorces à tester et sélectionner la température d'hybridation correspondant aux amorces.

Sur Primer test/Results report : ne conserver que les amorces ne se dimérisant pas entre elles.

#### Sur le logiciel MEGA6 : <http://www.megasoftware.net/>

Réaliser une base de séquences de référence issues de NCBI/GenBank regroupant toutes les séquences connues et cultivées des *Peredibacteraceae* ainsi que des séquences non cultivées du même groupe.

Aligner cette base de référence avec chacune des amorces, une par une.

Les amorces reverse devront être modifiés en reverse complément à partir du site [http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) pour être alignées avec la base de référence.

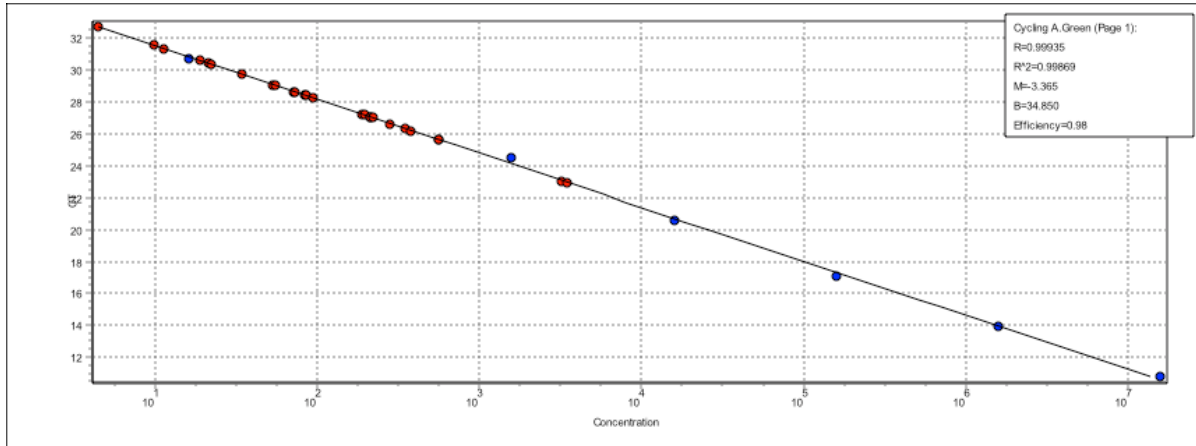
Ne conserver que les couples d'amorces qui ont le plus grand nombre de paires de base en commun coté 3' avec l'ensemble des séquences de référence.

#### Sur NCBI primer-blast

Réaliser un dernier Primer-blast avec le ou les amorces modifiées et vérifier qu'ils correspondent toujours avec les *Peredibacteraceae*.

## Annexe 4

Détail d'une des droites d'étalonnage obtenue



Détails des paramètres de gammes pour l'ensemble des runs qPCR effectués

Replicats	Echantillons	Amorces	Ct	R2	M	Efficacité
Replicat 1	Annecy	Bde2	0,15	0,99721	3,497	0,93
		Bx4	0,15	0,99869	3,365	0,98
		Per11	0,15	0,99025	-3,111	1
		Bact7	0,15	0,99138	-3,285	0,96
	Léman	Bde2	0,15	0,99421	-3,483	0,94
		Bx4	0,15	0,99932	-3,336	0,98
		Per11	0,15	0,99817	-3,337	0,99
		Bact7	0,15	0,99351	-3,173	0,91
	Annecy	Bde2	0,15	0,99498	-3,53	0,91
		Bx4	0,15	0,99936	-3,672	0,96
		Per11	0,15	0,99646	-3,646	0,99
		Bact7	0,15	0,99553	-3,387	0,96
Replicat 2	Annecy	Bde2	0,15	0,99994	-3,212	0,95
		Bx4	0,15	0,99063	-3,702	0,95
		Per11	0,15	0,99554	-3,353	0,97
		Bact7	0,15	0,99534	-3,549	0,91
	Léman	Bde2	0,15	0,99728	-3,207	0,96
		Bx4	0,15	0,99578	-3,505	0,93
		Per11	0,15	0,99703	-3,55	0,92
		Bact7	0,15	0,99982	-3,153	0,97
	Annecy	Bde2	0,15	0,99247	-3,292	0,94
		Bx4	0,15	0,99679	-3,617	0,98
		Per11	0,15	0,99223	-3,428	1
		Bact7	0,15	0,9932	-3,575	0,95

## Annexe 5

Récapitulatifs des principaux blasts obtenus sur un total de 48 séquences obtenues et blastées pour la vérification des couples d'amorces

Couple d'amorces vérifié	Exemple de résultats de séquence codant l'ARN 16S obtenues après BLAST	Score	E-value	% Query cover	% Ident
Bde2	<i>Bdellovibrio</i> sp. SKB1291214	324	4,00E-85	100	99
	<i>Uncultured Bdellovibrio</i> sp. clone 12L_106	324	4,00E-85	100	98
	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain 109J	324	4,00E-85	100	96
Bde3	<i>Bdellovibrio</i> sp. SKB1291214	815	0,00E+00	100	100
	<i>Uncultured Bdellovibrio</i> sp. clone hmyBd58	815	0,00E+00	100	99
	<i>Uncultured Bdellovibrio</i> sp. clone hmyBd41	809	0,00E+00	100	99
Bx4	<i>Bacteriovorax</i> sp. PNEc1	320	5,00E-84	100	97
	<i>Uncultured Bacteriovorax</i> sp. clone SDn2-47	135	7,00E-29	100	97
	<i>Bacteriovorax</i> sp. PC2	130	3,00E-27	100	97
Bx10	<i>Bacteriovorax</i> sp. EPC3	484	4,00E-133	100	99
	<i>Bacteriovorax</i> sp. PC2	460	6,00E-126	100	97
	<i>Uncultured Bacteriovorax</i> sp. clone LC-9-34	435	4,00E-118	100	96
Per6	<i>Peredibacter starnii</i> strain A3.12	1314	0,00E+00	100	99
	<i>Uncultured Peredibacter</i> sp. clone pe16	1291	0,00E+00	100	97
	<i>Uncultured Peredibacter</i> sp. clone pb8	1269	0,00E+00	100	97
Per11	<i>Uncultured Peredibacter</i> sp. clone pa11	469	0,00E+00	100	99
	<i>Uncultured Peredibacter</i> sp. Clone Per1	469	0,00E+00	100	99
	<i>Peredibacter starnii</i> strain A3.12	413	0,00E+00	100	98
Per12	<i>Uncultured deltaproteobacterium</i> clone 100M1G	561	0,00E+00	100	96
	<i>Uncultured delta proteobacterium</i> clone ARTE4_2	561	0,00E+00	100	96
	<i>Uncultured Peredibacter</i> sp. clone pe16	547	0,00E+00	100	96

### Annexe 6 :

Abondance relative mesurée par qPCR des différentes familles de BALOs exprimée en pourcentage avec différentes profondeurs confondues.

		<i>Peredibacteraceae</i>		<i>Bdellovibrionaceae</i>		<i>Bacteriovoracaceae</i>	
		0,2	2	0,2	2	0,2	2
Leman	Aout	5,496798	3,0459	0,00324	0,050995	8,07E-05	0,001275
	Sept	3,107129	1,855317	0,002382	0,005445	0,000391	0,003152
	Oct	0,424352	1,945209	0,001742	0,006607	0,001217	0,004871
	Nov	0,425441	0,252517	0,001351	0,003177	0,000466	0,00083
	Dec	12,39017	2,866622	0,001469	0,003726	0,002044	0,002337
	Jan	6,123193	2,024508	0,001839	0,006595	0,003943	0,00792
Bourget	Aout	3,409077	7,73657	0,00388	0,007287	0,00037	0,001774
	Sept	6,417804	8,503217	0,003193	0,004655	0,000789	0,004484
	Oct	3,008891	3,17723	0,002518	0,000886	0,00067	0,000358
	Nov	1,082809	2,899337	0,005625	0,004938	0,000739	0,001667
	Dec	4,886742	7,117733	0,00754	0,000641	0,000825	0,000395
	Jan	7,083988	5,033205	0,006433	0,01058	0,001227	0,00343
Annecy	Sept	0,857953	0,738242	0,002441	0,000472	0,000582	0,002085
	Nov	0,710626	1,635015	0,002197	0,012292	0,00057	0,006366
	Dec	11,47678	0,279249	0,003052	0,000826	0,000681	0,000245
	Jan	2,114297	0,001255	0,001952	0,004914	0,000403	0,007803

Abondance relative mesurée par qPCR des différentes familles de BALOs exprimée en pourcentage en fonction de deux profondeurs distinctes.

		<i>Peredibacteraceae</i>			<i>Bdellovibrionaceae</i>			<i>Bacteriovoracaceae</i>		
		Leman	Bourget	Annecy	Leman	Bourget	Annecy	Leman	Bourget	Annecy
Aout	2-3 m	1,2915	1,03971	NR	0,15317	0,04334	NR	0,00125	0,0002	NR
	45-50 m	0,02963	2,20339	NR	0,58997	0,21344	NR	0,00056	0,00084	NR
Sept	2-3 m	0,02697	8,36067	0,01145	0,01788	0,09108	6,7E-05	0,0043	0,00037	0,00037
	45-50 m	0,04326	1,18934	0,12881	0,44985	0,72824	0,0002	0,0011	0,00915	0,00369
Oct	2-3 m	0,05463	0,11267	NR	0,02474	0,00068	NR	0,01143	2,6E-05	NR
	45-50 m	0,45146	0,72491	NR	0,89588	0,36788	NR	0,08086	0,02199	NR
Nov	2-3 m	0,01083	0,95356	0,00822	0,01654	0,00342	2,2E-05	0,00034	0,0001	0,00197
	45-50 m	0,19529	1,01571	0,02962	0,24336	0,36366	0,00157	0,04301	0,0197	0,00073
Dec	2-3 m	1,4639	8,45775	0,00953	0,01396	0,06347	8,3E-06	0,00015	0,00702	0,00338
	45-50 m	0,01587	0,2338	0,12061	0,05921	0,25937	0,00083	0,00417	0,01048	0,00346
Jan	2-3 m	0,52353	7,01109	0,04105	0,0367	0,22527	0,00015	0,00181	0,04815	0,0139
	45-50 m	0,61424	1,44195	0,07527	0,02664	0,51529	0,00165	0,00297	0,03423	0,00251

## Résumé

Les « *Bdellovibrio* And Like Organisms » (BALOs) sont des bactéries prédatrices d'autres bactéries gram négatifs. Ces bactéries n'ont été que très peu étudiées à ce jour dans les milieux aquatiques comparativement à d'autres communautés et interactions biotiques (i.e. la prédation et/ou le parasitisme par les protistes eucaryotes, la pression exercée par le zooplancton, la lyse virale). Le nombre de travaux sur cette communauté biologique bien que limitée suggère néanmoins leur importance quantitative et fonctionnelle dans divers écosystèmes. Cette communauté bactérienne, de par ses interactions trophiques avec les autres bactéries, est en effet susceptible de jouer un rôle non négligeable dans le fonctionnement du compartiment microbien au sein des écosystèmes aquatiques. Il est donc aujourd'hui critique de mieux connaître et comprendre l'abondance, la distribution et la diversité de ces prédateurs bactériens ainsi que leurs incidence écologique sur des réseaux trophiques d'intérêt tels que ceux présents au sein des grands péri-lacs alpins. Le projet de recherche de ce stage de Master 2 avait donc pour objectif d'explorer et caractériser la structure, la diversité et l'abondance des BALOs dans trois lacs péri-alpins : les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget, sur une période s'étalant d'août à janvier. Dans ce but, nous avons testé, développé et vérifié des amorces (pour PCR et qPCR) permettant de cibler les principales familles de BALOs connues : les *Bdellovibrionaceae*, les *Bacteriovoraceae* et les *Peredibacteraceae*. Nos résultats révèlent que toutes les familles sont bien présentes dans les grands lacs avec une diversité (appréciée par PCR-DGGE et par clonage-séquençage) qui semble toutefois assez limitée. Au sein de cette diversité, il semble que les lacs soient des milieux très spécifiques, révélant parfois des homologies avec d'autres souches d'eau douce connue (mais pas marine) ou au contraire l'absence d'homologie avec les bases de données disponibles (suggérant donc potentiellement l'existence d'espèces inconnues spécifiques aux grands lacs péri-alpins). Nos résultats mettent aussi en lumière que les *Peredibacteraceae* constituent la famille la plus importante pouvant représenter à certains moments de l'année plus de 7% de l'ensemble des bactéries alors que la quantité des deux autres familles est plus restreinte. De plus l'occupation dans la colonne d'eau (surtout en surface pour les *Peredibacteraceae* vs. plus en profondeur pour les deux autres) révèle que ces trois groupes semblent avoir des stratégies/niches préférentielles différentes. *In fine*, l'ensemble de nos résultats suggère que les bactéries prédatrices de bactéries de par leur abondance, distribution et dynamique pourraient jouer un rôle non négligeable dans la mortalité bactérienne et les flux de matière au sein des lacs.

**Mots clés :** Bactéries, *Bdellovibrio*, BALOs, grands lacs péri-alpins, diversité, phylogénie, abondance, amorces, ARN 16S.