



**HAL**  
open science

# Les réseaux trophiques microbiens planctoniques diversité, structure, fonctionnement en milieu lacustre

Isabelle Domaizon

► **To cite this version:**

Isabelle Domaizon. Les réseaux trophiques microbiens planctoniques diversité, structure, fonctionnement en milieu lacustre. Biodiversité et Ecologie. Université de Savoie, 2010. tel-02823491

**HAL Id: tel-02823491**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02823491v1>**

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

## HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

# Les réseaux trophiques microbiens planctoniques : diversité, structure, fonctionnement en milieu lacustre

Domaizon Isabelle

### RAPPORTEURS :

<b>BOUVY MARC</b>	Directeur de Recherche	IRD - UMR 5119 Laboratoire ECOLAG – Montpellier 2
<b>DUPUY CHRISTINE</b>	Professeur d'Université	Université de La Rochelle - UMR LIENSS Institut Littoral Environnement Sociétés
<b>GILBERT DANIEL</b>	Professeur d'Université	Université de Franche Comté - Montbéliard Laboratoire de Chrono environnement UMR 6249

### EXAMINATEURS

<b>MONTUELLE BERNARD</b>	Directeur de Recherche	Cemagref -MAEP – Lyon
<b>LACROIX GERARD</b>	Chargé de recherches	ENS – BIOEMCO - Paris
<b>DORIOZ JEAN MARCEL</b>	Directeur de Recherche	INRA -UMR CARTEL - Thonon



# Organisation du manuscrit

## Chapitre I Aspects introductifs *p1*

---

1. Fiche synthétique .....	<i>p2</i>
2. Contexte de la demande HDR et Positionnement dans l'Unité de recherche .....	<i>p3</i>
3. Mise en perspective de la démarche scientifique .....	<i>p5</i>

## Chapitre II Synthèse des travaux de recherche *p11*

---

1. Dynamique, Structure, Régulation des Réseaux Trophiques Microbiens .....	<i>p12</i>
1.1 Intérêt général des études sur les réseaux trophiques aquatiques - contexte scientifique	<i>p12</i>
1.2. Synthèse des résultats acquis concernant la dynamique, la structure, et les facteurs de régulation des réseaux trophiques microbiens lacustres	<i>p22</i>
1.2.1. Dynamique des communautés microbiennes	
1.2.2. Structure des Réseaux trophiques Microbiens et estimation de flux trophiques	
1.2.3. Mise en évidence d'interactions biotiques peu prises en compte dans les réseaux trophiques	
1.2.4. Facteurs de régulation s'exerçant sur les communautés picoplanctoniques	
2. Diversité phylogénétique des eucaryotes unicellulaires lacustres .....	<i>p35</i>
2.1 Des protistes aux eucaryotes unicellulaires : Classification - Notion d'espèces – apports des outils moléculaires - contexte scientifique	<i>p35</i>
2.2 Les Picoeucaryotes (< 5µm) lacustres : une diversité nouvellement révélée	<i>p38</i>
2.3 Facteurs de contrôle de la structure des picoeucaryotes	<i>p43</i>
3. Une nouvelle vision des assemblages 'pico'eucaryotes lacustres : la question émergente du parasitisme eucaryote dans les systèmes planctoniques. ....	<i>p47</i>
3.1. La diversité taxonomique et fonctionnelle des protistes hétérotrophes modifiée par la prise en compte des groupes parasites – contexte scientifique	<i>p47</i>
3.2. Une approche quantitative de la diversité des groupes eucaryotes – les premiers résultats concernant la structure de l'assemblage eucaryote et la part des groupes parasites	<i>p49</i>
3.3. Point bibliographique concernant un groupe nouvellement suivi dans les milieux lacustres : Perkinsozoa	<i>p52</i>
4. Remarques synthétiques relatives aux résultats acquis et aux prologements de ces travaux de recherche .....	<i>p56</i>

- 
1. **Diversité et rôle des parasites eucaryotes en milieu lacustre : vers l'identification d'association hôtes-parasites** .....p64
    - Objectifs et approches mises en œuvre
    - Intérêt du projet et questions posées
    - Intégration du projet aux axes de recherches de l'UMR CARRETEL
  2. **Detection et rôle des espèces rares dans l'assemblage des eucaryotes unicellulaires** .....p 69
    - Intérêts et Objectifs
    - Contexte
    - Collaborations dans le cadre de ce projet
    - Insertion dans la problématique générale du laboratoire et programmes en cours
  3. **L'ADN fossile, un outil pour reconstituer l'évolution des communautés microbiennes lacustres sous contrôles climatique et anthropique : Approche paléo-écologique** ..... p73
    - Objectifs
    - Contexte, intérêts et aspects innovants
    - Approches méthodologiques
    - Collaborations dans le cadre de ce projet

---

## Chapitre IV Implications dans l'animation scientifique et pédagogique

- 
1. **Animation, Gestion de la Recherche et Transfert** .....p80
    - 1.1. Expériences d'encadrement, de gestion de projets, d'animation scientifique
    - 1.2. Contacts et réseaux scientifiques
    - 1.3. Activités administratives et d'évaluation scientifique
  2. **Activités pédagogiques et administratives liées à l'enseignement universitaire** .....p85
    - 2.1 Activités d'enseignement unierstaire
    - 2.2 Responsabilité de filière
    - 2.3 Autres activités pédagogiques

---

## Chapitre V Publications et communications scientifiques

Les publications relevant du bilan scientifique (1999-2009) sont numérotées de A1 à A18 en ce qui concerne les publications indexées, et, de B1 à B2 pour les publication dans revues non indexées par ISI web of knowledge. Cette numérotation est utilisée au cours du manuscrit pour faire référence à ces publications.

---

## Références bibliographiques

---

## Annexes



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### **Figures**

Fig 1a. Schéma retraçant le parcours professionnel ainsi que les domaines d'études, les groupes d'organismes étudiés, et les types d'approches et de méthodes mises en œuvre.

Fig 1b. Evolution des mots clés recensés dans les publications parues de 1999 à 2009 (Domaizon auteur ou co-auteur)

Fig 2. Schéma de réseau trophique planctonique testé en modélisation. Extrait de Hulot et al (2000)

Fig 3. Schéma simplifié de réseau trophique intégrant la boucle microbienne, d'après Amblard et al modifié. Extrait de Domaizon et al (2008)

Fig 4. Schéma de réseau trophique de complexité intermédiaire intégrant les groupes microbiens mixotrophes et parasitaires

Fig 5. a. Photos de Ciliés Lac du Bourget (échantillons de la strate 0-50m)

Fig 5.b. Relation linéaire significative ( $p < 0,05$ ) entre abondances des ciliés et des bactéries hétérotrophes (Lac du Bourget - strate 0-50m)

Fig 6. Dynamiques saisonnières des communautés microbiennes dans 2 lacs péri alpins (Léman Bourget). Figure extraite de Personnic et al 2009

Fig 7. Illustration des changements temporels dans la proportion de groupes bactériens (Lac du Bourget 2m et 50m). Figure extraite de Comte et al 2006

Fig 8 Illustration des changements saisonniers dans la structure en taille des bactéries hétérotrophes (Lac du Bourget 2m). Figure extraite de Comte et al 2006

Fig9. Evolution temporelle de la composition des eucaryotes lacustres (fraction de taille  $< 5\mu\text{m}$ - diversité révélée par T-RFLP). Fig extraite de Lepère et al 2006

Fig 10. Schéma conceptuel du fonctionnement du réseau microbien pélagique (Lac du Bourget strates 0-10m). Extrait de Comte et al. 2006

Fig 11. Changements saisonniers dans les voies trophiques : Mortalité bactérienne (% de production bactérienne) imputable aux différentes classes de taille planctoniques (zone épilimnique du lac du Bourget) Domaizon et al en prep.

Fig12. Taux de 'grazing' mesurés dans la zone épilimnique du lac d'Annecy (méthode d'ingestion des billes fluorescentes) par les flagellés non pigmentés et pigmentés. Figure extraite de Domaizon et al 2003.

Fig 14. Arbre phylogénétique de l'ensemble du vivant d'après Woese (1987)

Fig 15. Arbre phylogénétique des principaux groupes eucaryotes d'après Keeling et al (2005) modifié

Fig 16 abcd : Arbres phylogénétiques des Cryptophytes, Cercozoa, Centroheliozoa, Opisthokonts, Alveolates, Stramenopiles - Extraits de Lepère et al (2008).

Fig 17. Variation du nombre d'OTUs et Proportions de chaque groupe phylogénétique (eucaryotes unicellulaires) dans les bibliothèques de clones constituées pour différents types de traitements (contrôles, +Nutriments, + poissons planctivores, +Nutriments et poissons planctivores)

Fig 18. Fig 18: Résultats de l'analyse UNIFRAC effectuée afin de comparer les 9 bibliothèques de clones obtenues à T0 et T96h pour chacun des traitements soumis à la manipulation des facteurs Température, Nutriments, et UV.

Figure extraite de Domaizon et al en prep

Figure 19. Developmental stages of *Pirsonia* and *Pseudopirsonia* : Motile flagellates attach and penetrate frustule with a pseudopod. The pseudopod phagocytises and digests portions of the diatom protoplast and thus differentiates into the trophosome. Nutrients are transported into the body of the former flagellate, now called auxosome. The auxosome grows and divides, forming offspring as long as trophosomes continue to phagocytise. Extrait de Kühn et al 2004

Fig18 : Distribution verticale des paramètres biologiques et des principaux groupes eucaryotes ciblés par TSA-FISH sur 3 lacs d'état trophique différent. Figure extraite de Lepère et al soumis

Fig 20. Evolution temporelle de l'abondance des Perkinsozoa dans la strate 0-20m (Lac du Bourget )  
Figure extraite de Mangot et al. 2009

Fig 20a Negative staining of the zoospore of *Perkinsus* sp. isolated from *Macoma balthica*. Scale bar = 2  $\mu$ m (from Coss et al, 2001). Extrait de Mangot et al en révision

Fig 20b Light micrograph of the different live stages of cultured *Perkinsus mediterraneus* cells in JL-ODRP-2F medium. Trophozoites (T) showing a granular cytoplasm with a large vacuole (v) and a prominent vacuoplast (vp). *Perkinsus mediterraneus* divides by schizogony, and schizonts (S) vary in size. Scale bar: 20  $\mu$ m (from Casas et al, 2008). Extrait de Mangot et al en révision

Fig21. Illustration des principaux facteurs affectant la dynamique et diversité des communautés microbiennes (en rouge apparaissent les facteurs dont les impacts ont été pris en compte dans les travaux menés depuis 2000.

Fig 22. Illustration des 3 principaux volets de recherche s'inscrivant dans les perspectives à partir de 2010

Fig 23. Illustration simplifiée du 'positionnement' des parasites eucaryotes (stades libres zoospores) dans les modèles de réseaux trophiques planctoniques.

## Tableaux

Tableau 1. Effet des facteurs bottom-up et top-down manipulés (test par ANOVA à deux facteurs) extrait de Lepère et al (2007).

Tableau 2 : Résultats de l'ANOVA 3 facteurs mettant en évidence les effets structurant de l'augmentation de température, des radiations UV et des apports en nutriments : effets sur la structure des pico-eucaryotes (Étang de Thau). Extrait de Domaizon et al en prep.

Tableau 3 : Liste et séquences oligonucléotidiques des sondes élaborées et mises en application dans les milieux lacustres. Extrait de Lepère et al 2008, Mangot et al 2009, Lepère et al soumis.

Tableau 4 : Abondances moyennes obtenues pour chaque groupe d'eucaryotes unicellulaires ciblés par des sondes spécifiques au cours d'un suivi annuel (Lac du Bourget 0-20m). Extrait de Mangot et al (2009)





# Aspects introductifs

## 1. Fiche de présentation synthétique

ISABELLE DOMAIZON

Né(e) le 31 mai 1969

### PARCOURS PROFESSIONNEL ET FORMATION

#### Fonction actuelle

Chargé de recherche 1<sup>ère</sup> classe INRA

UMR INRA 42 CARRTEL Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques et Ecosystèmes Limniques

#### Parcours professionnel

Depuis septembre 2009 CR1 INRA UMR CARRTEL	Station INRA Thonon
De Septembre 2000 à sept 2009 Maître de Conférences *	Université de Savoie Chambéry
*De Sept 2005 à Sept 2007 Poste d'accueil en délégation INRA	Station INRA Thonon les Bains
1999-2000 Chercheur contractuel Lab. de Biologie comparée des Protistes	Université Blaise Pascal Clermont II
1996-98 : Attachée Temporaire à L'Enseignement et la Recherche	Université Blaise Pascal Clermont II

#### Formation universitaire 3ème cycle

Université Blaise Pascal (Clermont II)

• 1999 : Doctorat d'Université Spécialité : Biologie des Populations et Ecologie

Mention : Très honorable, Félicitations du jury Dir : Pr. Jean Dévaux Date de soutenance : 1999

Titre : Impact de la carpe argentée *Hypophthalmichthys molitrix* sur l'organisation des communautés planctoniques et la qualité de l'eau – Expériences en mésocosmes. Laboratoire d'accueil : Biologie Comparée des Protistes UMR CNRS 6023

• 1993 : Diplôme d'Etudes Approfondies Biologie Option : Protistologie

### ACTIVITES DE RECHERCHE

#### Domaine : diversité, structure, fonctionnement des réseaux trophiques microbiens lacustres

Les travaux de recherche développés relèvent de l'écologie fonctionnelle appliquée au milieu lacustre, l'objectif général étant d'identifier les liens existants entre l'organisation des communautés planctoniques et le fonctionnement des écosystèmes lacustres.

Les questions abordées concernent l'étude (i) de la diversité des communautés microbiennes planctoniques (ii) des interactions trophiques s'établissant entre les communautés microbiennes et des transferts trophiques vers le réseau supérieur (iii) des facteurs de régulation qui affectent la dynamique, la structure, la diversité et l'activité des micro-organismes planctoniques.

#### 5 dernières Publications scientifiques

- MANGOT J.-F., LEPÈRE C., BOUVIER C., DEBROAS D., **DOMAIZON I., 2009** - Community structure and dynamics of small eukaryotes (<5 µm) targeted by new oligonucleotide probes: a new insight into the lacustrine microbial food web. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(19), 6373-6381
- PERSONNIC S., **DOMAIZON I.,** DORIGO U., BERDJEB L., JACQUET S., **2009** - Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio- and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. **Hydrobiologia**, 627, 1, 99-111
- PERSONNIC S., **DOMAIZON I.,** SIME-NGANDO T., JACQUET S., **2009** - Seasonal variations of microbial abundances and virus- vs. flagellate-induced mortality of picoplankton in three peri-alpine lakes. **J. Plankton Res.** 31(10):1161-1177
- LEPÈRE C., **DOMAIZON I.,** DEBROAS D., **2008** - Unexpected importance of potential parasites in the Composition of the freshwater small eukaryotes community. **Appl. Environ. Microbiol.**, 74, p. 2940-2949
- LEPÈRE C., **DOMAIZON I.,** DEBROAS D., **2007** - Community composition of lacustrine small eukaryotes in hyper-eutrophic conditions in relation to top down and bottom up factors. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 61, 3, p. 483-495

#### Animation scientifique

- **Responsable de l'Equipe BioFEEL** Biodiversité Fonctionnement Evolution des Ecosystèmes Lacustres (UMR CARRTEL)
- **Co directrices de thèses** : Lepère C (2006) Personnic S (2006) Berdjeb L (2010) Mangot JF (2010) Sotton B (2013)
- **Maitre d'apprentissage** Villar C. 2009-2011 (Master 1 et 2)
- **Coordination de programmes de Recherche** 2 prog. Cible (Région) ; 1 prog. EC2CO INSU ; 1 projet innovant INRA EFPA

### ACTIVITES PEDAGOGIQUES

#### Enseignement universitaire

Université de Savoie 2000-2005 et de 2007 à 2009 Volume horaire 192h équivalent TD / an au minimum

#### Responsabilité de filière d'enseignement

2007 à 2009 : **Master 1 Biologie EPGM** (Environnement gestion protection des milieux de Montagne) Univ.de Savoie

## 2. Contexte de la candidature HDR et positionnement dans l'Unité de Recherche

Ce bilan scientifique est effectué après neuf années en tant que Maître de Conférences (Université de Savoie), et, un tout récent recrutement en tant que Chargé de Recherche INRA au sein du département EFPA. Lors de mon entrée en fonction à l'université, le laboratoire d'accueil que j'intégrais initiait sa structuration en UMR avec la station Hydrobiologique INRA de Thonon. Le cœur des activités de recherche de ce laboratoire concerne le fonctionnement des écosystèmes lacustres péri-alpins, l'élaboration d'indicateurs d'état et d'évolution de la qualité des milieux aquatiques ainsi que la gestion des ressources aquatiques lacustres. Aussi, ce fut pour moi un contexte particulièrement favorable au développement de mes activités de recherche puisque ma formation universitaire ainsi que mon expérience de recherche doctorale et post doctorale étaient centrées sur l'étude et la gestion des milieux aquatiques d'eau douce.

Mes travaux de recherche ont débuté au sein du laboratoire de Biologie des protistes (aujourd'hui laboratoire LMGE -Université Blaise Pascal Clermont II), dans lequel j'ai acquis des connaissances en limnologie générale, et plus particulièrement sur le fonctionnement des réseaux trophiques lacustres. Les questions abordées concernant la structure et les facteurs de régulation des réseaux trophiques herbivores (phytoplancton-metazooplancton-poissons) puis des réseaux trophiques microbiens (Matières Organiques-Bactéries/picophytoplancton-Protistes hétérotrophes) m'ont permis d'acquérir des approches et techniques valorisables rapidement lors de mon intégration dans le laboratoire CARRTEL. Au sein de cette UMR j'ai pu très logiquement développer des problématiques de recherche concernant prioritairement l'écologie des protistes, leur diversité et leurs interactions avec les autres communautés planctoniques. Ce type de problématique se situait à l'interface des études déjà développées sur le compartiment bactérien d'une part et le réseau planctonique herbivore d'autre part. Cette complémentarité a donc été assez rapidement mise à profit, notamment au travers de collaborations dans le cadre de programme de recherche, de co-encadrements d'étudiants, et, de mon implication dans le suivi des communautés microbiennes lacustres (en lien avec l'Observatoire 'Lacs péri-alpins'). Ces travaux ont permis d'alimenter les données relatives à la diversité et au fonctionnement des réseaux trophiques microbiens, en utilisant en parallèle des approches écosystémiques et expérimentales, des méthodes moléculaires et des méthodes de microscopie.

Cette période universitaire a été interrompue par deux années de délégation INRA effectuées à la station Hydrobiologique de Thonon, deux années qui m'ont permis, de favoriser la rédaction de projets de recherche (appels d'offre EC2CO INSU, Région Rhône Alpes, ANR) dont certains ont pu être financés, la participation à des missions scientifiques et le développement de collaborations, ainsi que l'encadrement

d'étudiant en thèse avec notamment un effort de publication de nos travaux, et bien sur, une implication accrue dans le collectif scientifique de l'UMR CARRETEL. Cette période de délégation a sans aucun doute largement motivée ma candidature au poste de chargé de recherche INRA (CR1: Diversité et fonctionnement des réseaux trophiques microbiens planctoniques lacustres) que j'ai intégré depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2009.

Aujourd'hui, l'état d'avancement de mes travaux de recherche me semble propice à la réalisation d'un bilan scientifique et à l'élaboration de nouvelles perspectives de recherche, ce qui m'a conduit à la rédaction de ce document en vue de l'obtention de l'HDR. L'évolution et la maturation de ces travaux de recherche s'est opérée grâce à un travail d'encadrement d'étudiants (doctorat ou master, et récemment post-doctorat), de collaborations basées sur la constitution d'un réseau scientifique stimulant, d'implications dans le collectif scientifique de l'UMR CARRETEL avec notamment une récente expérience d'animation de l'équipe BioFEEL (depuis mai 2008) ; autant d'aspects de l'activité de Recherche que je souhaite continuer à privilégier.

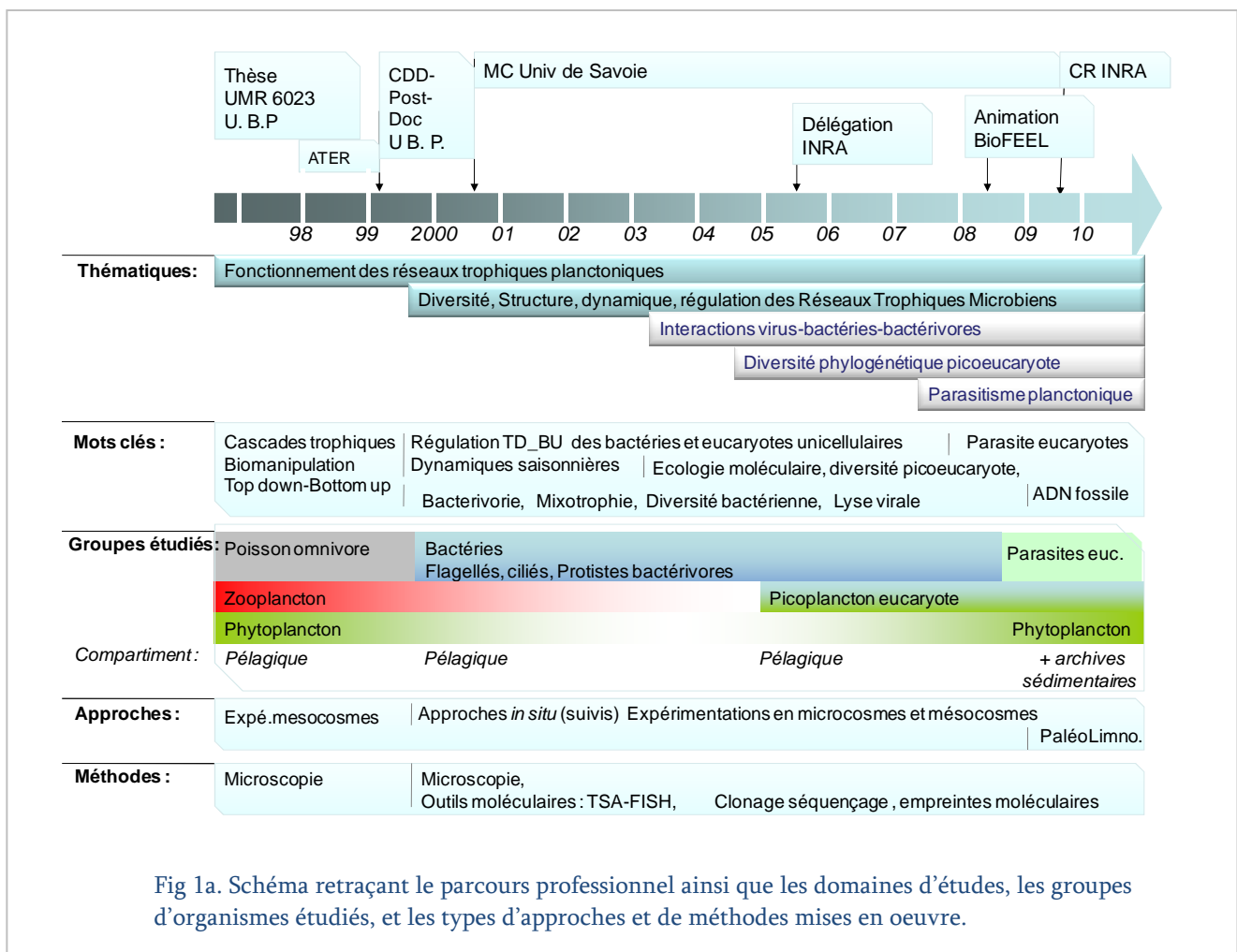
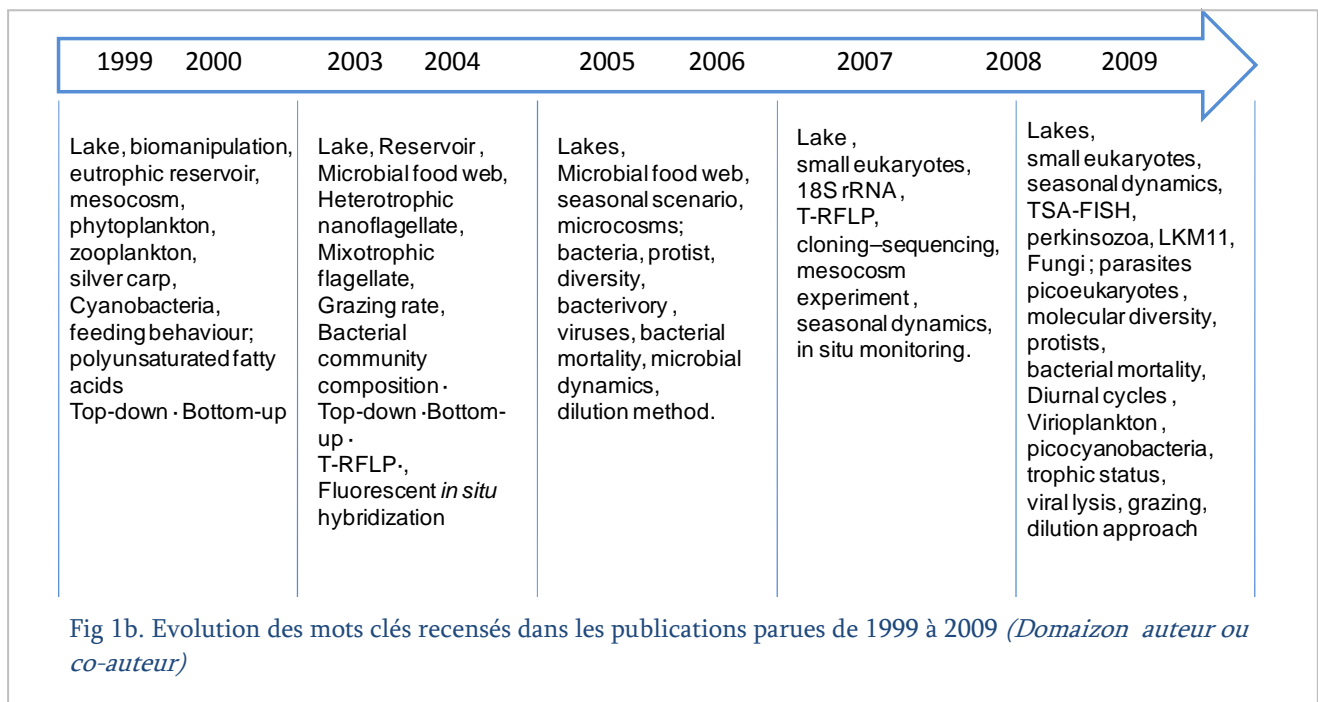


Fig 1a. Schéma retraçant le parcours professionnel ainsi que les domaines d'études, les groupes d'organismes étudiés, et les types d'approches et de méthodes mises en oeuvre.



### 3. Mise en perspective de la démarche scientifique

Un rapide inventaire parmi les mots clés recensés dans les travaux publiés au cours de mes 10 années de recherche, permet à la fois de souligner l'évolution des questions et outils de recherche mais également de repérer une continuité dans le domaine de spécialisation relatif aux réseaux trophiques lacustres ainsi que dans le type d'approches utilisées (Fig 1a 1b).

Ma formation à la recherche en limnologie a débuté au sein de l'équipe 'Hydrobiologie' du laboratoire de Biologie des Protistes (LMGE), équipe développant des travaux relatifs au fonctionnement des systèmes aquatiques, et à la place des protistes dans les réseaux trophiques lacustres. Les projets de recherche que j'ai développés au cours des périodes pré-doctorale et doctorale sous la direction du Pr Jean Dévaux, concernaient les impacts de la prédation d'un poisson omnivore filtreur sur l'organisation des communautés planctoniques en système eutrophe. Les potentialités d'utilisation de ces poissons dans le cadre de biomanipulation visant à réduire le développement de fleurs d'eau à cyanobactéries était une des questions centrales de ce travail, ainsi que le décryptage des effets directs et indirects de la présence de différentes biomasses de ces poissons (poissons filtreurs et poissons chasseurs à vue) sur la structure des communautés planctoniques.

A cette période (fin des années 90), bien que de nombreux modèles de relation phosphore-état trophique-qualité des eaux aient déjà été établis (Schindler & Fee 1974, Schindler et al, 1987 ; Barroin, 1990, 1991;

Mazunder 1994) et que des essais de restauration et/ou manipulation de lacs et plans d'eau eutrophes soient déjà initiés, de nombreux travaux en limnologie étaient toutefois encore centrés sur les mécanismes de l'eutrophisation et des perturbations associées à l'eutrophisation (il est d'ailleurs notable que ces questions restent d'actualité encore aujourd'hui, en particulier dans les pays en développement (numéro spécial *Hydrobiologia* 58(1) 2007)).

S'il était alors acquis que la relation positive entre chlorophylle et phosphore total représente un, voire le, processus biologique fondamental de la productivité des lacs (Mazunder 1994), toutefois l'influence du régime thermique (dans les lacs tempérés) ainsi que celui de la structure des réseaux trophiques (présence de zooplancton herbivore : cladocères, calanoïdes) étaient également reconnus comme des facteurs de contrôle de la biomasse phytoplanctonique (Mazunder et al 1990, Carpenter et al 1996, Schindler et al 1997). D'assez nombreux débats alimentaient alors les contrôles respectifs par les ressources et les prédateurs, et les théories des cascades trophiques en systèmes lacustres (Carpenter & Kitchell 1992 ; DeMelo et al, 1992; Bronmark et al, 1992 ; Lazzaro & Lacroix 1995 ; Polis & Stong 1996). Les potentialités et les limites des techniques de biomanipulation étaient émergentes dans le but de réguler la biomasse phytoplanctonique (Ramcharan et al, 1996 ; Harris 1996 ; Polis et al, 2000 ; Lammens 2001). C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse et, je me suis alors spécialisée (i) dans l'analyse des interactions poissons filtreurs-zooplancton-phytoplancton, et, (ii) dans la mise en œuvre d'approches expérimentales en mésocosmes qui représentent des outils permettant d'analyser des situations complexes prenant en compte plusieurs niveaux trophiques, dans des conditions relativement proches des conditions naturelles (A1, A2, A3, B2). L'exercice que représente la reconstitution du puzzle des interactions trophiques et l'analyse des effets 'dominos' des cascades trophiques m'a particulièrement enthousiasmé.

Aussi, les travaux de recherche qui ont suivis (période post-doctorale, et MCF université de Savoie) ont été développés dans une relative continuité de thématique et d'approches, se focalisant sur l'analyse des réseaux trophiques, mais avec toutefois des orientations nouvelles puisque le compartiment picoplanctonique et les communautés de la boucle microbienne ont été intégrés dans ces questions de recherche. Ces orientations ont été dictées à la fois par l'évolution du contexte scientifique, par les résultats acquis qui permettaient de soulever d'importantes questions concernant la place des communautés microbiennes hétérotrophes dans les modèles d'interactions trophiques planctoniques, et bien sur, par certaines avancées méthodologiques (outils moléculaires notamment).

Des approches écosystémiques et expérimentales, menées initialement au sein du laboratoire de Biologie des protistes (janv 1999-sept 2000) m'ont permis d'intégrer les groupes microbiens : bactérioplancton (pigmenté, et non pigmenté), protistes bactériophages (flagellés et ciliés essentiellement), dans l'analyse de la

structure trophique des communautés planctoniques. Ces communautés microbiennes constituant les acteurs de la boucle microbienne (réseau parallèle connecté à la chaîne alimentaire classique) décrite par Pomeroy et al (1974), Azam et al (1983), Porter et al (1985), avaient été reconnues depuis plusieurs années comme significativement impliquées dans la productivité du système pélagique lacustre, une partie non négligeable des flux de carbone transitant par la boucle microbienne (Weisse et al, 1990 ; Sherr & Sherr 1994). Après les travaux novateurs de Stockner & Porter (1988) qui sont parmi les premiers à expliciter l'organisation de réseaux trophiques microbiens en milieu lacustre, les années 90 voient s'accroître les références bibliographiques relatives au fonctionnement de la boucle microbienne (Weisse et al, 1990 ; Sanders et al, 1992 ; Simek et al, 1990, 1996 ; Gasol & Vaque, 1993 ; Gasol, 1994 ; Caron, 1994 ; Sherr & Sherr, 1994 ; Amblard et al, 1995 ; Jurgens et al, 1994,1997 ; Jurgens & Gude, 1994, 1997 ; Laybourn-Parry & Walton, 1998). Pourtant, en 2004, Kalinowska notera que moins de 10% des informations relatives à la limnologie sont centrées sur les organismes et les processus métaboliques repérables dans les réseaux trophiques microbiens (RTM) lacustres. Par ailleurs d'assez nombreuses controverses apparaissent dans la littérature, probablement en lien avec les interactions complexes directes et indirectes qui sont repérables au sein des RTM : par exemple, (i) l'hypothèse de régulation par les ressources selon laquelle la disponibilité et/ou la qualité des substrats organiques et éléments minéraux sont essentiels dans la production bactérienne (Carlson & Ducklow, 1995 ; Pace & Cole, 1994ab), (ii) les multiples dimensions que peut prendre l'impact de la prédation exerçant un contrôle significatif sur l'abondance des populations bactériennes (Simek et Straskrabova, 1992) mais également pouvant présenter un aspect sélectif (Monger & Landry, 1991,1999), et, de plus étant en partie liée à l'état physiologique des cellules bactériennes proies (Del Giorgio et al, 1996), (iii) la diversité des 'prédateurs' potentiels du bacterioplancton, i.e. les protistes phagotrophes (Sanders et al, 1992), mais également le zooplancton métazoaire (Jurgens et al, 1994) auxquels s'ajoute le poids de la lyse virale (Fuhrman & Noble, 1995 ; Fuhrman & Schwalbach, 2003).

Depuis la publication de ces travaux, et la reconnaissance unanime du rôle clé des communautés microbiennes dans les cycles biogéochimiques et le fonctionnement trophique des lacs, un important centre d'intérêt en écologie aquatique concerne la compréhension des interactions complexes s'établissant au sein de la boucle microbienne, et, celle des facteurs de régulation qui affectent la dynamique, structure et activité des divers groupes fonctionnels microbiens. Notamment, l'importance relative de la régulation par les ressources et la prédation s'exerçant sur les communautés microbiennes procaryotiques et eucaryotiques, est encore largement discutée à l'heure actuelle (Pernthaler, 2005; Simek et al, 2007, Grossart et al, 2008 ; Solic et al, 2010). C'est dans ce contexte que se positionnent les travaux que j'ai



développés notamment au cours de la période 2000-2006 (et dont certains se prolongent encore aujourd'hui), concernant les questions relatives aux effets structurants Bottom up (nutriments) et Top down (prédation) repérables au sein des réseaux microbiens pélagiques. L'effort a notamment porté sur l'évaluation de l'impact de la prédation au sein du réseau trophique microbien, qui, longtemps, dans la plupart des travaux, a été testé sur des groupes fonctionnels uniques (exemple : limitation des bactéries hétérotrophes par les nanoflagellés hétérotrophes) sans prendre en compte la diversité structurelle et/ou fonctionnelle du picoplancton. Aussi, les objectifs des travaux menés ont été :

- d'une part, d'étudier la dynamique saisonnière et spatiale des communautés microbiennes dans les grands lacs périalpins afin de mettre en évidence des modifications saisonnières nettes dans l'importance des divers groupes microbiens en lien avec les changements des paramètres environnementaux (physiques, chimiques, biologiques). L'hypothèse de travail centrale était que, des changements nets s'opéraient dans les voies de transfert de la matière et dans l'importance relative des facteurs de régulation en fonction de la période d'étude et de la typologie du lac.

- d'autre part, d'estimer l'impact de divers prédateurs (flagellés, ciliés, zooplancton métazoaire) sur la structure et la dynamique de la communauté microbienne, en prenant en compte une activité de bactériovorie taxon-spécifique, et en considérant non seulement l'abondance totale des cellules picoplanctoniques (bactéries hétérotrophes et picoplancton autotrophe), mais également la composition des assemblages bactériens (groupes identifiés par des marquages moléculaires), ou encore, l'activité des bactéries et/ou leur structure en taille.

En parallèle, dans le cadre d'une collaboration intra-CARRTEL (S Jacquet -CR) la dynamique du compartiment viral et le poids de la lyse virale dans la régulation du bactérioplancton ont été appréhendés par des approches expérimentales réalisées *in situ*, afin de quantifier l'importance relative de ces facteurs de régulation (prédation *vs* lyse virale) s'exerçant sur le bactérioplancton (Thèses [S. Personnic](#) et [L. Berdjeb](#)).

Les données acquises au cours de ces travaux ([A4](#), [A6](#), [A10](#), [A11](#), , [A14](#), [B1](#)) viennent alimenter la bibliographie concernant en particulier les dynamiques et les processus de pertes affectant les communautés microbiennes, la régulation de la diversité microbienne, le rôle du picoplancton dans le cycle des éléments (Nakano et al, 1998, 2001 ; Gurung et al, 2001 ; Middelboe et al, 2003 ; Samuelsson & Andersson, 2003; Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004 ; Bettarel et al, 2005 ; Fuhrman & Noble, 2005 ; Jardillier et al, 2005ab; Bouvy et al, 2006 ; Suttle 2007).

Il est apparu au cours de ces travaux que, parmi les acteurs clés des réseaux trophiques microbiens, les pico- et nano-flagellés (<2-3µm, et <20µm respectivement) étaient en partie constitués par des taxa qui ne

présentaient que peu ou pas de caractéristiques morphologiques permettant de les distinguer et de les identifier précisément 'en microscopie classique. Aussi la mise en application d'outils moléculaires, qui s'est largement 'démocratisée' au début des années 2000, et qui a, en particulier, été mise à profit en milieu marin pour décrypter la diversité picoplanctonique (Lopez-Garcia et al, 2001 ; Lopez Garcia & Moreira 2008 ; Massana et al, 2002, 2004 ; Šlapeta et al, 2005) s'est révélée incontournable pour progresser dans la connaissance de la diversité structurelle et fonctionnelle de la fraction planctonique de petite taille (<5µm) en milieu lacustre.

Aussi, l'écologie moléculaire est une approche que j'ai intégrée à ma démarche scientifique à partir des années 2006, initialement en partenariat avec le LMGE (D Debroas) et dans le cadre de la [thèse de C Lepère](#). Les outils tels que le clonage séquençage, les méthodes d'empreinte moléculaire, ont été appliquées afin non seulement d'estimer la diversité phylogénétique des assemblages eucaryotes <5µm, mais également de décrire la dynamique *in situ* de cette diversité et sa réponse à divers facteurs de forçages (nutriments, prédation, température, lumière ...). L'acquisition de données moléculaires basées sur l'analyse des gènes codant pour la petite sous unité ribosomale (18S essentiellement) a permis d'alimenter significativement les données acquises concernant la composition de la fraction protiste 'picoplanctonique' ([A8](#), [A9](#), [A12](#)), tandis que des données similaires étaient acquises de manière assez massive dans d'autres milieux aquatiques (Worden, 2006 ; Šlapeta et al, 2006ab ; Fuller et al, 2006 ; Massana et al, 2008 ; Massana & Pedros-Alio, 2008 ; Guillou et al, 2008).

Les résultats produits ont permis d'apporter un éclairage nouveau sur l'organisation des réseaux microbiens, en mettant en lumière notamment à la fois, la présence de groupes phylogénétiques rarement identifiés dans les milieux lacustres, et, la présence de groupes fonctionnels tels que des groupes parasites peu pris en compte dans les modèles de fonctionnement des réseaux trophiques (Park et al, 2004 ; Lafferty et al, 2006 ; Amundsen et al, 2009 ; Byers 2009).

Aussi, dans la continuité de ces résultats le développement d'outils de ciblage (sondes oligonucléotidiques spécifiques) a été mis en œuvre afin de passer à une étape de quantification des divers groupes phylogénétiques présents dans la fraction planctonique <5µm. Ces approches quantitatives ont apporté des informations essentielles concernant la distribution de ces groupes dans les milieux aquatiques ([A15](#), [A16](#), [A17](#)) et ont permis de cadrer les études à venir concernant le rôle précis de divers groupes phylogénétiques eucaryotes peu connus en milieu lacustre (LKM11 par exemple). Ce travail, effectué en partie dans le cadre de la [thèse de J F Mangot](#), se poursuit actuellement avec une volonté de cibler en particulier les groupes eucaryotes parasites peu connus en milieu lacustre, tels que les Perkinsozoa (Alvéolés).

De nombreuses questions sont aujourd'hui en émergence dans le prolongement de ces travaux de recherche, certaines de ces questions (place des espèces rares, parasitisme eucaryote) seront plus particulièrement détaillées dans le chapitre 'Perspectives' de ce manuscrit.

L'ensemble des travaux évoqués ci avant s'inscrit dans une démarche de compréhension des interactions biotiques et abiotiques structurant les réseaux trophiques microbiens (RTM). Ils ont été orientés par les nombreuses questions relatives aux modifications des conditions environnementales, dont certaines sont rattachées aux problématiques 'changement global' (effet du réchauffement des eaux, des radiations UV, des modifications des apports en nutriments et matières organiques allochtones).

Dans la démarche scientifique mise en place au cours de ces 10 années, on notera une diversité dans les échelles d'observations (spatiales et temporelles). Un travail à des micro-échelles a été mené pour l'analyse de certains processus biotiques (interactions biotiques repérables au sein des RTM ; processus se déroulant à l'échelle de quelques heures à jours). En parallèle la dynamique de communautés à des échelles saisonnières, voire pluri-annuelles a été investiguée. Le couplage d'approches expérimentales (microcosmes, mésocosmes) et écosystémiques a été privilégié, notamment, en vue de connecter les processus microbiens aux transferts s'effectuant vers les niveaux métazooplanctoniques voire piscicoles. L'évaluation des effets des changements environnementaux sur le fonctionnement du système planctonique lacustre nécessite des études multi-échelles et multi-compartiments. Cette diversité sera conservée dans les perspectives affichées, puisque très récemment la notion de trajectoire et d'évolution à long terme des écosystèmes est intégrée dans ma démarche scientifique, en particulier *via* les approches paléo-écologiques.

Les travaux pour lesquels j'ai tenté, dans ce paragraphe introductif, de broser la trame évolutive, sont illustrés et 'contextualisés' dans le chapitre suivant (bilan scientifique 1999-2009) autour de 3 thématiques portant sur l'organisation des réseaux trophiques microbiens planctoniques, la diversité phylogénétique des unicellulaires eucaryotes (protistes), et, la vision nouvelle portée sur les assemblages protistes planctoniques hétérotrophes.

# **Synthese des travaux de recherche**

**1999-2009**

Les questions de recherche développées depuis 1999 s'intègrent toutes à la problématique générale du fonctionnement des écosystèmes lacustres. Ces études s'intéressent à la fois à la **structure des réseaux trophiques**, en prenant en compte la **diversité des communautés** microbiennes et leurs **interactions biotiques**, à la **dynamique** (spatiale et temporelle) des communautés microbiennes planctoniques et, aux **facteurs de régulation** impliqués dans ces dynamiques. Afin d'illustrer ces travaux, les principaux résultats sont structurés autour de 3 thématiques pour lesquelles des avancées ont été réalisées au cours de ces dernières années :

- (i) L'organisation et le fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques lacustres (§ 1)
- (ii) L'éclairage apporté par les approches moléculaires appliquées à l'étude de la diversité des unicellulaires eucaryotes lacustres (§ 2)
- (iii) La vision nouvelle portée sur les protistes hétérotrophes et les premiers résultats acquis concernant la place des parasites eucaryotes dans les assemblages planctoniques hétérotrophes (§ 3).

Afin de replacer ces résultats dans un contexte scientifique global, ils sont précédés de rappels concernant les contextes scientifiques, à savoir : l'intérêt général et la portée des études (enjeux scientifiques) concernant les systèmes lacustres et leurs structures trophiques, les apports des outils moléculaires au décryptage de la diversité des pico-eucaryotes, la place du parasitisme planctonique eucaryote.

## 1. DYNAMIQUE, STRUCTURE, REGULATION DES RESEAUX TROPHIQUES MICROBIENS

### 1.1. Intérêt général des études sur les réseaux trophiques aquatiques et contexte scientifique

#### # Milieux lacustres : des systèmes réactifs sous pressions climatiques et anthropiques

Les écosystèmes aquatiques sont des systèmes sensibles aux changements environnementaux et aux stress anthropiques, de plus, ils sont souvent caractérisés par des temps de réaction relativement courts en comparaison aux écosystèmes terrestres (au moins face à certaines perturbations) (Hornung & Reynolds 1995). Les pressions exercées sur les systèmes aquatiques induisent donc des réponses assez rapidement visibles, ou enregistrables, ce qui fait d'eux, des systèmes sentinelles intéressants. Aujourd'hui, chercheurs et gestionnaires s'interrogent sur le devenir à long terme de ces écosystèmes. La compréhension du fonctionnement et de la dynamique de ces systèmes est primordiale pour pouvoir comprendre leur évolution, évaluer leur "état de santé" et mieux les gérer.

Bien sur, des acquis et expériences font déjà références dans ce domaine. En effet, à partir des années 60, les systèmes lacustres situés dans des zones à fort développement économique, ont subi d'importantes

perturbations liées l'accroissement des activités humaines et aux déversements d'eaux usées ou contaminées. Une lente prise de conscience s'en est suivie concernant les problèmes environnementaux et la nécessaire protection de ces milieux en raison, entre autres, de leur rôle dans l'alimentation en eau potable, dans la production piscicole, ou encore leur intérêt sur le plan touristique. Si la mise en place de mesures de gestion et protection, concernant notamment les problèmes d'eutrophisation et le traitement des apports en phosphore, s'est traduite par des améliorations sensibles, il n'en reste pas moins que la gestion environnementale des lacs demeure cruciale pour la préservation des biens et usages associés aux systèmes aquatiques. De nombreuses questions sont seulement partiellement éclairées concernant par exemple le développement des cyanobactéries, les transferts de polluants, l'efficacité de transfert au sein des réseaux trophiques en tant que facteur de productivité... Comme l'illustre les publications récentes de Schindler et al, 2008a, Carpenter 2008, Carpenter et al, 2008 ; Schindler & Hecky 2009, Schelske 2009, l'actualité des débats est réelle concernant les facteurs limitant le développement du phytoplancton et surtout les leviers opérationnels devant être choisis pour gérer les problèmes de qualité d'eau.

Par ailleurs, aujourd'hui apparaissent de nouvelles problématiques concernant notamment la présence dans les systèmes lacustres de polluants tels que les PCB, HAP, ou les contaminants émergents (substances pharmaceutiques...).

D'une manière globale, les pressions locales se traduisent aujourd'hui par une persistance de rejets de polluants en lien notamment avec l'anthropisation des bassins versants ; à ceci, viennent s'ajouter les effets potentiels des changements plus globaux et plus particulièrement le réchauffement climatique qui peut remettre en cause certaines dynamiques de restauration des lacs en ré-oligotrophisation. Le cas des grands lacs péri-alpins (Léman, Annecy, Bourget) est très représentatif des perturbations majeures subies par un grand nombre d'écosystèmes lenticques tempérés. A titre d'exemple, dans le lac Léman (menacé dans les années 50 par l'enrichissement en phosphore, eutrophe dans les années 80, et actuellement en réoligotrophisation, avec toutefois une évolution de l'état biologique qui n'est pas toujours en phase avec l'amélioration de l'état chimique), un réchauffement moyen de 1,5°C est enregistré au cours des 25 dernières années, et ce type de modification semble d'ores et déjà avoir des répercussions sur les dynamiques saisonnières du plancton (Anneville et al, 2002, 2005 ; Molinero et al, 2006), et sur certaines populations piscicoles (phénologie du cycle reproducteur notamment ; Gillet & Dubois 2007, 2008) ainsi que sur les synchronismes (match/mismatch) entre proies planctoniques et prédateurs expliqués à la fois par les variations thermiques et la baisse globale des teneurs en phosphore.

Bien que des scénarios se dessinent concernant les réponses des réseaux trophiques lacustres face aux facteurs de forçages environnementaux, il est clair que les effets de ces pressions climatiques et

anthropiques au niveau de la dynamique et de la structure des communautés animales, végétales, microbiennes, doivent être mieux appréhendés dans un objectif global de gestion des lacs. Les Questions et enjeux majeurs en limnologie s'inscrivent dans la compréhension de la stabilité et résilience des systèmes, du rôle de la biodiversité (diversité d'organisation des réseaux trophiques, diversité taxonomique et fonctionnelle des micro-organismes...) dans la réponse des écosystèmes et dans le maintien de leur productivité et qualité globales.

Si la compréhension globale du fonctionnement des écosystèmes lacustres nécessite la prise en compte de nombreux compartiments et interfaces (interface pelagos/benthos en vue d'expliquer les processus de remises à disposition de charges internes en nutriments par exemple ; dynamique et qualité des apports allochtones depuis le bassin versant ; Aspects hydrodynamiques influençant l'organisation des communautés et la qualité chimique de l'eau...), il n'en reste pas moins que de nombreux indicateurs d'état et de qualité sont recherchés parmi des descripteurs planctoniques et piscicoles des réseaux trophiques pélagiques.

En effet, l'étude du fonctionnement des réseaux trophiques, qui reflète l'état global du système lac, est depuis longtemps, et demeure, une thématique centrale en écologie lacustre. **La structure des réseaux trophiques détermine dans une large mesure les voies et l'efficacité de transfert entre niveaux trophiques, et ainsi peut permettre de comprendre la productivité du milieu, les modalités de transferts de polluants.** Par conséquent, afin de comprendre comment les changements environnementaux locaux ou globaux influencent le fonctionnement des systèmes aquatiques, il est nécessaire de connaître les processus qui déterminent la structure de ces réseaux trophiques. Et, bien que d'assez nombreux travaux de recherche au cours des dernières décennies aient permis de révéler les modifications dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, dont les causes sont trouvées dans le contexte de changements climatique et anthropique, il n'en reste pas moins que **les mécanismes précis reliant les facteurs de forçage** (à différentes échelles) **et la variabilité de la diversité structurelle et fonctionnelle des écosystèmes n'ont pas été complètement identifiés.**

#### *# Les réseaux trophiques lacustres : organisation et fonctionnement (de la chaîne trophique au réseau trophique)-Importance des micro-organismes dans les réseaux planctoniques*

La compréhension du fonctionnement biologique des écosystèmes est basée en grande partie sur l'analyse des relations trophiques. Chaque écosystème est caractérisé par une structure trophique que l'on peut définir en fonction du type d'espèces présentes, de leur organisation en groupes fonctionnels, du nombre de liens trophiques, de la connectance (ratio entre le nombre de liens trophiques entre les espèces d'un

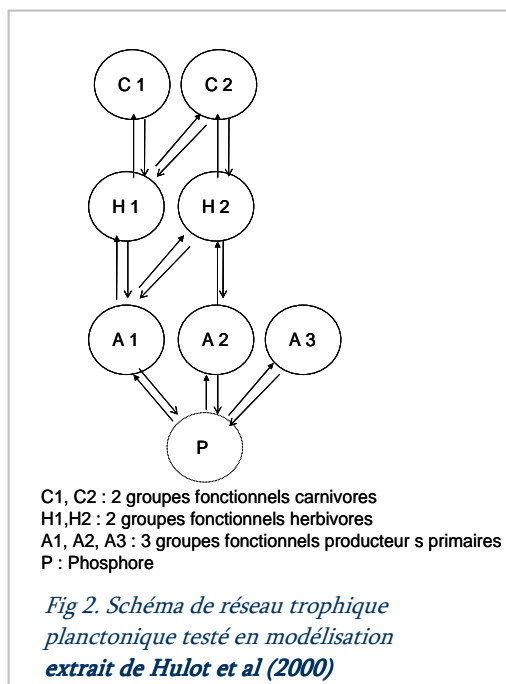
réseau et le nombre possible de liens en théorie), des longueurs de chaînes trophiques. Il est nécessaire de prendre en compte la dynamique de cette structure trophique qui peut varier au cours du temps, ou en fonction d'une zonation particulière au sein de l'écosystème qui conduit à l'organisation en sous systèmes connectés entre eux ou pas (réseau trophique benthique, pélagique ...). La dynamique saisonnière est particulièrement marquée dans les systèmes lacustres, qui sont caractérisés, en zone tempérée, par des cycles saisonniers de stratification et déstratification gouvernés par la température et d'autres facteurs climatiques (le vent notamment).

Au-delà de cette diversité structurelle (à priori reproductible) orchestrée par les rythmes saisonniers, l'organisation et la dynamique des populations planctoniques dépendent d'une manière globale de nombreux facteurs physico-chimiques et biotiques (ressources, compétition, prédation, parasitisme) variables au cours du temps. Le rôle de ces facteurs de régulation est souvent abordé de manière dichotomique, en opposant le contrôle ascendant exercé par les ressources au contrôle descendant exercé par la prédation. Si la structuration des réseaux trophiques a tout d'abord été envisagée selon l'hypothèse de régulation par les ressources, aujourd'hui, les articles scientifiques et chapitres de livres décrivant l'effet structurant exercé par les poissons sur l'organisation du réseau trophique sont extrêmement abondants (se comptant par milliers) comme l'attestent les références recensées par R. Drenner (<http://www.bio.tcu.edu/drenner/bib.html>). Les deux concepts, celui de la limitation par les ressources ou « bottom up », et celui du contrôle par les prédateurs ou « top down », coexistent, et il est aujourd'hui bien acquis qu'ils ne sont pas mutuellement exclusifs.

Dans les écosystèmes lacustres pélagiques, le schéma d'organisation trophique le plus simpliste correspond à la pyramide trophique classique représentant les biomasses des 4 niveaux trophiques : producteurs primaires, herbivores (en zone pélagique, metazooplancton essentiellement), planctonophages et carnivores. Cette vision linéaire de l'organisation trophique, bien que schématique puisque regroupant par exemple tous les producteurs primaires dans un seul grand groupe fonctionnel, a permis de développer de nombreuses théories relatives aux régulations de type Top-Down et Bottom-Up. Ces travaux ont notamment permis de mettre évidence les phénomènes de cascades trophiques (Paine 1980 ; Carpenter & Kitchell 1993) qui ont ensuite donné lieu à divers types de modèles de fonctionnement : modèle bottom up:top down (McQueen et al, 1986), modèle proies dépendant (Oksanen et al, 1981 ; Persson et al, 1992), modèle ratio dépendant (Arditi et al, 1991). Mais des limitations apparaissent pour chacun de ces modèles. Ils sont d'une manière générale caractérisés par une structure linéaire problématique lorsqu'il s'agit de



replacer notamment le rôle trophique des omnivores exerçant une ‘régulation intermédiaire’ et la prédation intragilde<sup>1</sup> (Lazzaro & Lacroix, 1995).



Bien évidemment, l’organisation des réseaux trophiques est largement plus complexe, notamment en raison de la position des organismes omnivores ne pouvant s’intégrer dans un schéma trophique linéaire, également en raison du fait que de nombreux organismes (consommateurs) changent de niveau trophique au cours de leur vie en modifiant leurs stratégies alimentaires. Par ailleurs la prédation sélective est également un facteur important contribuant à diversifier les groupes fonctionnels<sup>2</sup> devant être pris en compte dans les schémas de fonctionnement des réseaux trophiques. Les travaux de Hulot et al (2000) illustrent parfaitement ceci. Les auteurs développent et testent un modèle de réseau trophique de

complexité intermédiaire dans lequel à chaque ‘étage’ trophique il apparaît nécessaire de séparer des groupes fonctionnels afin de prédire de manière satisfaisante les effets d’un enrichissement en nutriments sur l’organisation du réseau trophique. On aboutit ainsi pour le niveau des producteurs primaires à 3 groupes fonctionnels, et pour le niveau du zooplancton herbivore à 2 groupes fonctionnels (Fig 2).

Par ailleurs, les flux de matière et d’énergie ont été définitivement appréhendés sous forme de réseaux complexes avec la mise en évidence de l’importance de la boucle microbienne. Les travaux de Pomeroy (1974) et Azam et al (1983) ont permis de formaliser le concept de la boucle microbienne, par l’ajout au schéma linéaire classique, du compartiment bactérien et des organismes protistes hétérotrophes, représentant ainsi la circulation de la matière organique via les bactéries (hétérotrophes et autotrophes) et l’activité de broutage des protistes flagellés et/ou ciliés qui sont eux même consommés par le métazooplancton. (Fig 3).

<sup>1</sup> Capacité d’un prédateur à consommer des proies qui utilisent le même type de ressources alimentaires que lui et qui sont donc ses compétiteurs potentiels

<sup>2</sup> Groupes d’organismes homogènes sur le plan de leur rôle fonctionnel car partageant le même type de ressources et les mêmes prédateurs

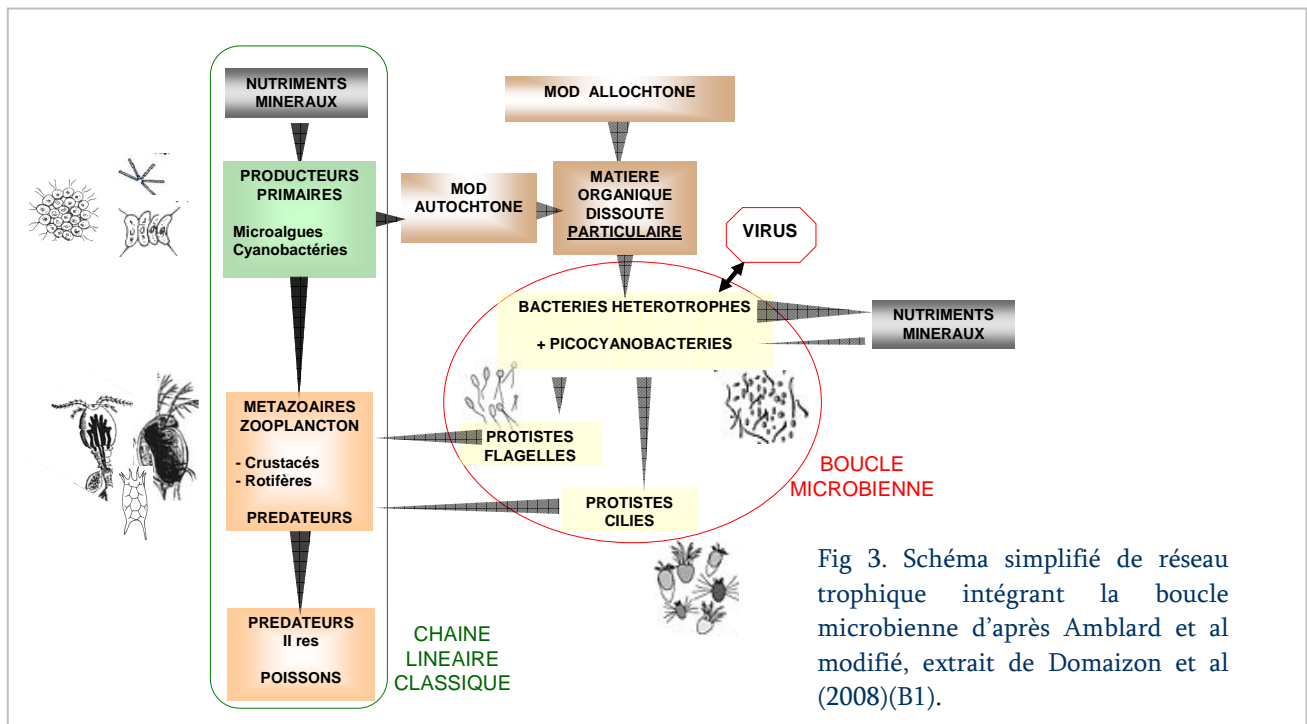


Fig 3. Schéma simplifié de réseau trophique intégrant la boucle microbienne d'après Amblard et al modifié, extrait de Domaizon et al (2008)(B1).

Si l'existence des **réseaux herbivore** ou métazooplanctonique (nutriments-phytoplancton- zooplancton-poissons) et **microbien** (Matière Organique Dissoute -Bactéries/picophytoplancton-Protistes hétérotrophes) est aujourd'hui bien établie, la part prépondérante de l'une ou l'autre de ces voies dans le fonctionnement global des réseaux pélagiques est encore mal appréciée. Par ailleurs, il est clair que le couplage des 2 réseaux dans un réseau multivore (Legendre & Rassoulzadegan 1995, Auer et al, 2004 ; Myualert et al, 2006) s'opère aux travers de nombreuses interactions (impliquant des effets directs et indirects entre les groupes fonctionnels, et avec les ressources minérales et organiques) qui conduisent à établir des schémas complexes dont la validité a rarement été testée.

L'intégration des communautés de la boucle microbienne dans les schémas de réseau trophique est délicate, notamment en raison de la connaissance seulement partielle des groupes fonctionnels microbiens, également en raison du pas de temps différents auxquels les processus microbiens s'opèrent en comparaison des communautés macroscopiques. Toutefois c'est un effort qui est important pour aboutir à une meilleure compréhension du fonctionnement du système, compte tenu des rôles clés joués par les micro-organismes aquatiques dans la circulation d'éléments biogènes, que ce soit en tant que décomposeurs et agents de re- mineralisation de la matière organique, ou en tant que producteurs de biomasse ou encore, consommateurs représentant un maillon important des chaînes trophiques.

Les efforts faits pour prendre en compte ces communautés microbiennes dans les réseaux d'interactions planctoniques identifient généralement des groupes fonctionnels selon la taille et le mode de nutrition des

organismes. L'assemblage microbien planctonique est composé de cellules procaryotes ou eucaryotes appartenant aux fractions pico- nano- ou micro planctoniques (correspondant respectivement aux classes de taille <2 µm, 2 à 20 µm, 20 à 200 µm), au sein de chaque classe de taille des rôles fonctionnels variés sont identifiés : décomposeurs, producteurs primaires, bactérivores, parasites, mixotrophes.

La structure et diversité des réseaux trophiques microbiens sera discutée dans la synthèse des travaux présentés ci après, il est toutefois utile de rappeler ici les grandes lignes de l'organisation de ces communautés constituant la boucle microbienne :

Au sein de la plus petite fraction de taille, les groupes **procaryotes** (Eubactéries et Archaea) qui présentent en zone pélagique lacustre des densités généralement comprises entre  $10^5$  et  $10^7$  cellules/ml, sont des communautés clés de part leur rôle dans le cycle des éléments chimiques et leur propriété de générer, à partir de la matière organique dissoute, des nutriments minéraux parfois rapidement réutilisés dans le milieu (entre autres par le phytoplancton). Aujourd'hui l'implication des divers groupes procaryotes dans les cycles biogéochimiques sont toujours des sujets centraux en écologie lacustre. S'il existe une connaissance générale des cycles des éléments (C,N,P), les acteurs de ces cycles (groupes phylogénétiques impliqués par exemple) sont seulement partiellement connus. On peut prendre à titre d'exemple, le cas du cycle de l'azote qui est aujourd'hui revisité à la lumière des connaissances acquises sur les processus d'oxydation anaérobie de l'ammonium (anamox) et le rôle probablement sous-estimé des Archae dans la nitrification en milieu aquatique (Agogue et al, 2008 ; Martin-Cuadrado et al, 2008 ; Auguet & Casamayor 2008 ; Auguet et al, 2009).

Outre le rôle de recycleurs les groupes procaryotes sont importants de par leur production de biomasse qui alimente les niveaux trophiques supérieurs par l'intermédiaire protistes phagotrophes flagellés et ciliés (Fenchel, 2008), et qui peut dans certains milieux être un soutien important de la productivité globale du système (Lennon & Cottingham 2008 ; Perga et al 2009).

Les procaryotes sont également largement représentés par des groupes **pigmentés** autotrophes (picocyanobactéries), dont la densité peut varier de  $10^4$  à  $10^8$  cellules/ml selon les environnements étudiés (Carrias et al, 1996 ; Zippel & Schimmele, 1999). Le genre *Synechococcus* est majoritairement retrouvé parmi les picocynaobactéries en milieu lacustre (Katano et al, 2001 ; Chen et al, 2006). Au sein de l'assemblage picophytoplanctonique, l'abondance relative des organismes **eucaryotes** est variable selon les systèmes (marins, côtiers, lacustres), les niveaux trophiques, et la dynamique spatio-temporelle de ces communautés. Les densités de picoeucaryotes atteignent typiquement  $10^2$  à  $10^4$  cellules/ml dans la zone euphotique des lacs ou des océans. (Caron et al, 1999), parmi lesquels une fraction autotrophe eucaryote vient s'associer aux picocyanobactéries pour contribuer à la production primaire. Le picophytoplancton

peut supporter de 10 à 70% de la production primaire en milieu pélagique lacustre (Li et al, 1983 ; Raven, 1998 ; Stockner et Shortreed, 1989 ; Metzler et al. 2000). La fraction picoplanctonique autotrophe peut donc représenter une part plus importante de la production primaire que les classes de taille nano- et micro- phytoplanctoniques (Agawin et al, 2000). En raison de leur petite taille, de leur composition pigmentaire et de leur fort potentiel de croissance, les picoalgues semblent particulièrement bien adaptées aux milieux oligotrophes, notamment en période de déficience nutritive (Stockner & Shortreed, 1991).

L'importance fonctionnelle des **eucaryotes hétérotrophes** dans les réseaux microbiens planctoniques a été démontrée, notamment au travers d'études relatives aux rôles des nanoflagellés (HNF) et ciliés qui sont généralement considérés comme étant les principaux prédateurs du bactérioplancton (sherr & sherr, 1984, 1994 ; Sanders et al, 1989, 2000). Ils sont par ailleurs capables d'ingérer des cellules phytoplanctoniques de plus grande taille (nanophytoplancton plus particulièrement). Les plus forts taux de broutage de bactéries sont souvent exercés par les cellules hétérotrophes de taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$  (Sherr et al, 1997; Thouvenot et al, 1999). Ces 'pico'-hétérotrophes représentent ainsi un maillon trophique important en ce qui concerne le transfert de matière et d'énergie vers les niveaux trophiques supérieurs. Par ailleurs, ils interviennent dans le processus de minéralisation de la matière organique (Stockner & Antia, 1986 ; Caron et al, 1999) certains hétérotrophes sont notamment capables d'utiliser, par osmotrophie (transfert de molécules organiques au travers de la membrane), la matière organique dissoute de haut poids moléculaire (Sherr, 1988). Les observations microscopiques révèlent qu'en milieu lacustre une très grande majorité des protistes flagellés hétérotrophes dénombrés sont des cellules dont la taille est comprise entre 2 et 5  $\mu\text{m}$  (sur le lac Pavin par exemple près de 70% (560 cellules/ml)). L'identité de ces protistes qui apparaissent uni-flagellés ou bi flagellés, sphériques ou ovoïdes, n'est généralement pas clairement déterminée par les techniques d'observations microscopiques classiques (Carrias et al, 1998). A titre d'exemple, en zone euphotique du barrage Sep, les cellules flagellées dont la position systématique est incertaine, les « monas like cells » et les flagellés indéterminés (2-5  $\mu\text{m}$ ) représentent en moyenne une densité de 696 cellules/ml, comptant ainsi pour 87% des flagellés hétérotrophes totaux (Thouvenot et al, 1999). Les limites des approches morphologiques en microscopie classique ont en partie motivé l'utilisation d'approches moléculaires (voir §2).

Aux rôles trophiques classés de manière dichotomique en photoautotrophie ou l'hétérotrophie stricte, s'ajoutent de nombreux comportements mixotrophes repérés au sein des réseaux trophiques microbiens. Des autotrophes obligatoires possèdent en effet cette capacité à utiliser de manière facultative des ressources organiques par osmotrophie, voire par phagotrophie, il s'agit alors d'organismes possédant une double compétence alimentaire (mixotrophes). Divers types de mixotrophes peuvent être répertoriés,

certaines utilisant la mixotrophie de manière obligatoire, d'autres de manière facultative. On distingue généralement d'une part les mixotrophes principalement autotrophes et utilisant l'osmotrophie ou la phagotrophie seulement pour obtenir des composés rares ou en conditions de ressources limitantes (faible luminosité, faible disponibilité en éléments nutritifs dissous ...); et, d'autre part, les mixotrophes principalement hétérotrophes essentiellement phagotrophes qui sont susceptibles de s'orienter vers la phototrophie afin par exemple de suppléer à un manque de nourriture (faible abondance de proies); parmi ces organismes certains utilisent la séquestration de chloroplastes issus d'algues ingérées (Stoecker 1998; Jones 2000; Stickney et al, 2000). Il existe des résultats contradictoires dans la bibliographie quant à l'importance relative de la mixotrophie dans le fonctionnement global et la productivité des systèmes planctoniques (Cleven & Weisse 2001; Bouvier et al, 1998; Weisse & Muller 1998; Havskum & Riemann, 1996). Les micro-organismes connus pour leur capacité de mixotrophie sont généralement de taille supérieure à 5 µm (Dinoflagellés par exemple), mais le compartiment picoplanctonique peut également contenir des espèces mixotrophes, tels que les genres *Ochromonas* et *Poterioochromonas* (Chrysophyceae) connus pour leur capacité à alterner la phagotrophie et la phototrophie en fonction des conditions environnementales (Bennet et al, 1990; Katechakis & Stibor, 2006).

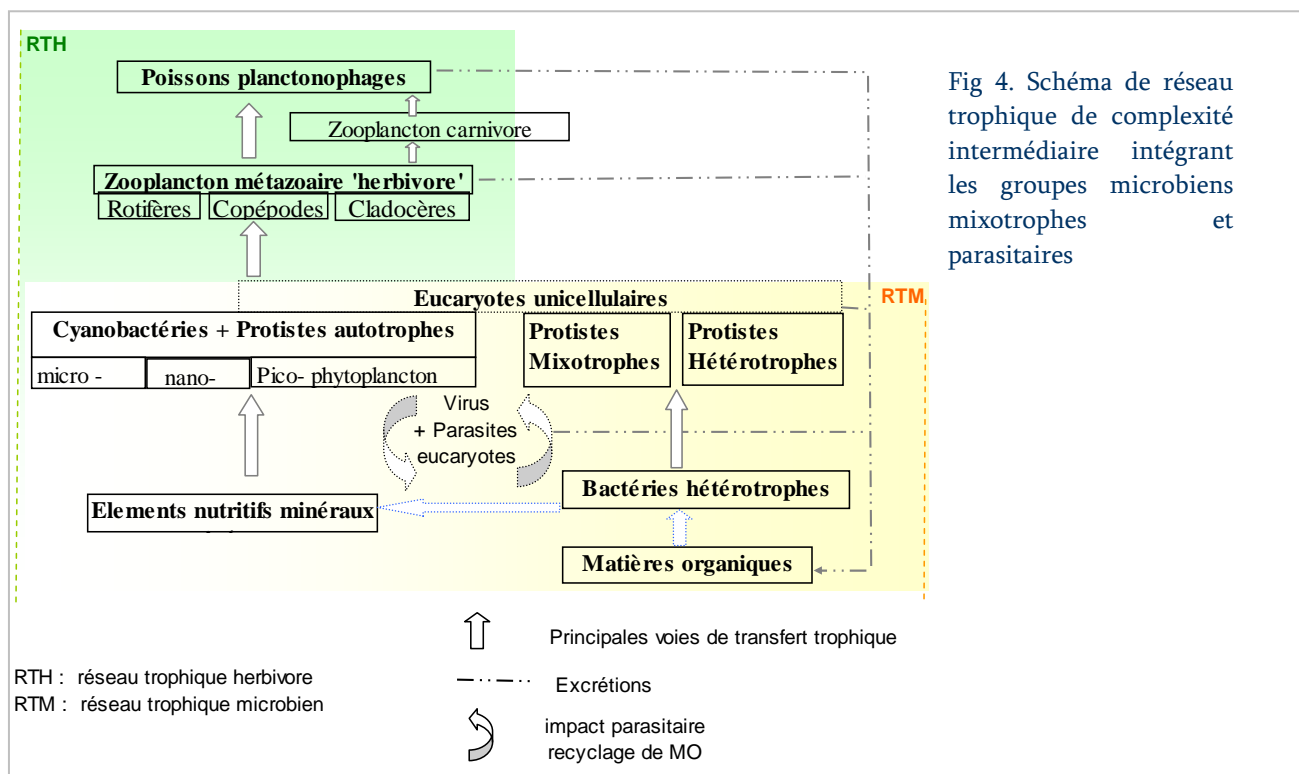


Fig 4. Schéma de réseau trophique de complexité intermédiaire intégrant les groupes microbiens mixotrophes et parasitaires

La découverte relativement récente de la grande quantité de **virus** aquatiques (Bergh et al, 1989) qui représentent des agents de mortalité susceptibles d'impacter toutes les communautés planctoniques, a par ailleurs apporté une complexité supplémentaire aux réseaux microbiens. La lyse virale souvent étudiée au

travers de son rôle dans la mortalité bactérienne, peut affecter également les flux de carbone via la redistribution de matière organique suite aux lyses cellulaires (Bratbak et al, 1995).

Les **parasites eucaryotes** (chtytrides notamment, Syndiniales en systèmes marins, et sûrement d'autres groupes encore mal appréhendés) sont également susceptibles d'exercer un rôle régulateur non négligeable dans les dynamiques planctoniques (Park et al, 2004 ; Lafferty et al, 2006). En milieu d'eau douce, les informations acquises concernant le rôle parasitaire des eucaryotes dans les réseaux planctoniques est essentiellement centré sur les chytrides (Ibelings et al, 2004), avec notamment la mise en évidence de taux de prévalence élevés sur des hôtes phytoplanctoniques. Toutefois les parasites eucaryotes sont divers et, ils sont généralement caractérisés par des cycles de vie relativement complexes. Certains stades de développement peuvent se retrouver dans la fraction picoplanctonique, les zoospores (2-5 $\mu$ m) de Chytrides représentent un exemple typique ; ces stades infectieux sont susceptibles de parasiter les microalgues (diatomées, dinoflagellida, chlorophyta, chrysophyta) dans les lacs, les réservoirs ainsi qu'en milieu marin (Ibelings et al, 2004). Le parasitisme eucaryote planctonique peut toucher des hôtes appartenant à différents niveaux trophiques et, représente ainsi un facteur important dans la compréhension des structures trophiques : nombre de liens trophiques, degré de connectance entre les groupes fonctionnels (Arias Gonzales & Morand, 2006). Le parasitisme implique des effets en cascades sur les phénomènes de compétition entre espèces phytoplanctoniques, et peut impacter, comme les virus, les dynamiques et successions saisonnières planctoniques (Kagami et al, 2004). Par ailleurs les zoospores (formes flagellées libres) sont consommées par le metazooplancton (Daphnia) et créent un transfert de nutriments des algues (hôtes du parasite) vers le zooplancton, lien nommé Mycoloop par Kagami et al (2004). La plupart des modèles de fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques ne prennent pas en compte l'effet du parasitisme sur les différentes communautés planctoniques, et probablement en raison de limites techniques et méthodologiques ces micro-organismes ont très rarement été identifiés et dénombrés dans les milieux lacustres. L'intérêt de progresser dans la connaissance des ces groupes est clair, et il est probablement renforcé dans le contexte du réchauffement des eaux. En effet, le développement parasitaire étant généralement favorisé pour des températures élevées (conditions thermiques estivales), le réchauffement printanier précoce des eaux pourrait induire une dynamique particulière de ces interrelations.

A la lumière de ce rapide point bibliographique, il apparaît que, les modalités d'assemblage d'espèces, l'importance respective des prédateurs, du parasitisme, et des ressources dans l'organisation des communautés ainsi que les répercussions de leurs effets au sein des chaînes trophiques font encore aujourd'hui l'objet de nombreux travaux et discussions (Brett et al, 2009 ; Lazzaro et al, 2009 ; Sabo et al,

2009). A l'heure actuelle, nous ne disposons pas encore de modèles solides d'organisation et de fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques. Et si nous avons identifié certaines relations entre groupes fonctionnels, nos schémas sont encore souvent des simplifications un peu trop caricaturales de la réalité, et n'intègrent généralement qu'une partie des communautés, avec une ségrégation assez nette entre les informations acquises pour les groupes planctoniques de grande taille ( $> 20\mu\text{m}$ ) et celles acquises pour les groupes microbiens. **L'élaboration de modèle d'organisation des réseaux trophiques planctoniques nécessite la construction de matrices d'interactions trophiques pertinentes et pour ceci nous sommes encore probablement en manque de données descriptives et expérimentales qui permettront de tester les théories de fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques.**

Aussi, l'un des principaux centre d'intérêt en écologie aquatique a concerne la compréhension : (i) la diversité de ces micro-organismes afin notamment de discerner des groupes fonctionnels pertinents (ii) la compréhension des interactions directes, et indirectes s'établissant au sein des communautés planctoniques (ii) des facteurs de régulation qui affectent la dynamique, la structure et l'activité des divers groupes fonctionnels microbiens.

## **1.2. Synthèse des résultats concernant la dynamique, la structure, et les facteurs de régulation des réseaux trophiques microbiens lacustres**

### **1.2.1. Dynamique des communautés microbiennes : Connaître la dynamique pour comprendre l'écologie des micro-organismes dans leur milieu naturel**

Objectifs: Une étape importante pour progresser dans la connaissance de la structure et du fonctionnement du système lacustre est l'acquisition de données concernant la dynamique des communautés planctoniques pouvant être reliées à l'évolution des diverses variables d'état caractérisant les systèmes limniques. Si les communautés phytoplanctoniques et zooplanctoniques ont bénéficié des nombreux efforts de suivis pour acquérir des séries chronologiques concernant leur évolution spatio-temporelle il n'en est pas de même pour les communautés microbiennes, en particulier sur les grands lacs péri alpins. Aussi, les approches écosystémiques de suivi des communautés microbiennes planctoniques (bactéries, picocyanobactéries, virus, protistes flagellés et ciliés) qui ont été menées depuis 2002 ont permis de combler la rareté des données concernant la distribution spatiale et temporelle de ces groupes d'organismes. Les dynamiques obtenues pour les divers communautés microbiennes ont été confrontées les une aux autres et également mises en relation avec l'évolution des paramètres environnementaux (caractéristiques physico-chimiques et biotiques). **Outre l'acquisition d'informations descriptives**

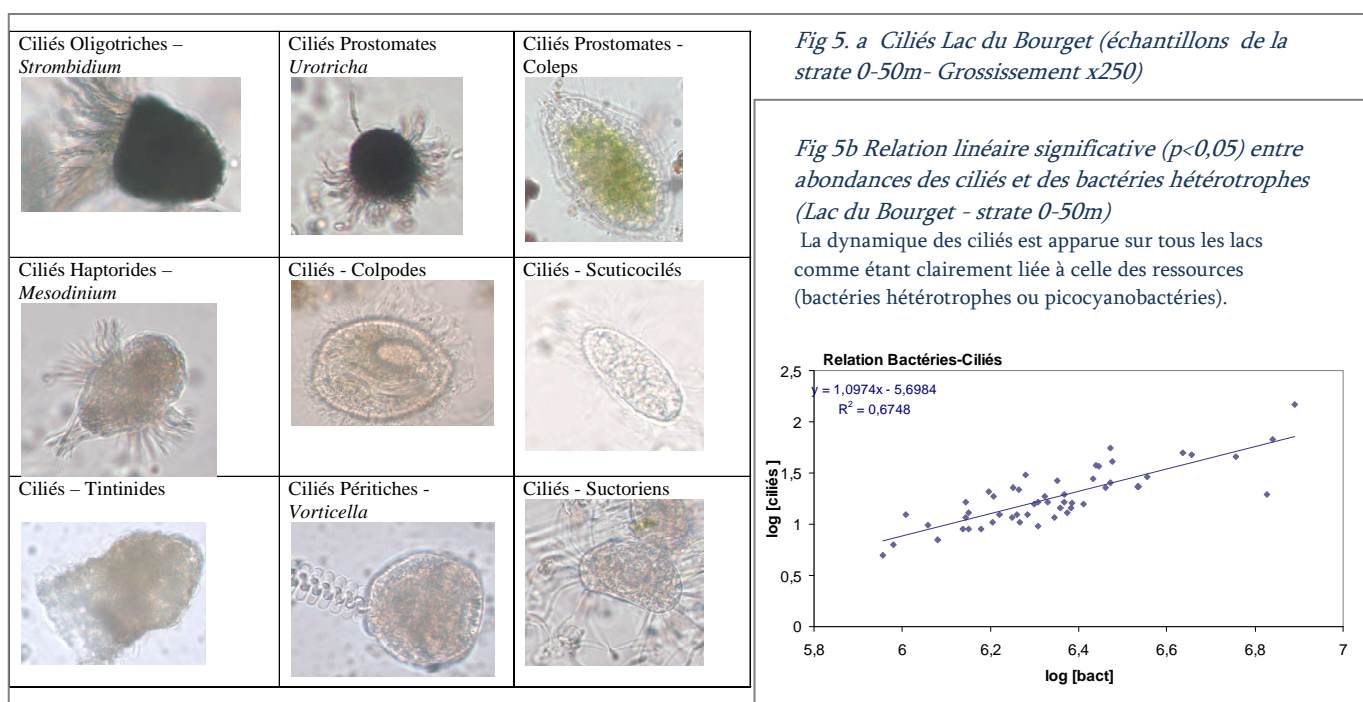
concernant les valeurs d'abondance, de biomasse et de production nécessaires pour caractériser les milieux étudiés, ces travaux avaient également pour but d'établir des hypothèses concernant (i) les interactions entre communautés (ii) les changements dans la composition des communautés qui reflètent la diversité structurelle et fonctionnelle observable à différentes échelles spatiales et temporelles (ii) les facteurs de régulation impliqués dans la dynamique de ces organismes.

Il est à noter que ces travaux se sont appuyés sur la logistique de l'observatoire des lacs peri-alpins (ORE Lacs) qui assurent, de longue date, un suivi de la qualité des eaux de ces lacs. La connaissance de ces dynamiques a par ailleurs constitué une base essentielle pour l'organisation des approches expérimentales menées sur ces lacs afin de tester certaines hypothèses concernant les interrelations s'établissant dans ces réseaux planctoniques.

### Principaux résultats

#### ➤ A une échelle d'observation pluriannuelle : des successions saisonnières reproductibles pour les groupes microbiens

Les dynamiques saisonnières et spatiales des communautés virales, bactériennes et picophytoplanctoniques et protistes hétérotrophes, acquises par cytométrie en flux (dans le cadre de la thèse S. Personnic – Fig 6), et par microscopie inversée ou directe en épifluorescence, ont permis de mettre en évidence la reproductibilité des dynamiques d'une année à l'autre mais également de mettre en évidence des moments clés (par exemple des périodes de forte concentration virale suggérant une lyse virale potentiellement importante), et également d'établir des relations entre la dynamique des communautés picoplanctoniques et les facteurs environnementaux, à l'échelle d'un lac ou en tenant compte de plusieurs systèmes lacustres (A14).





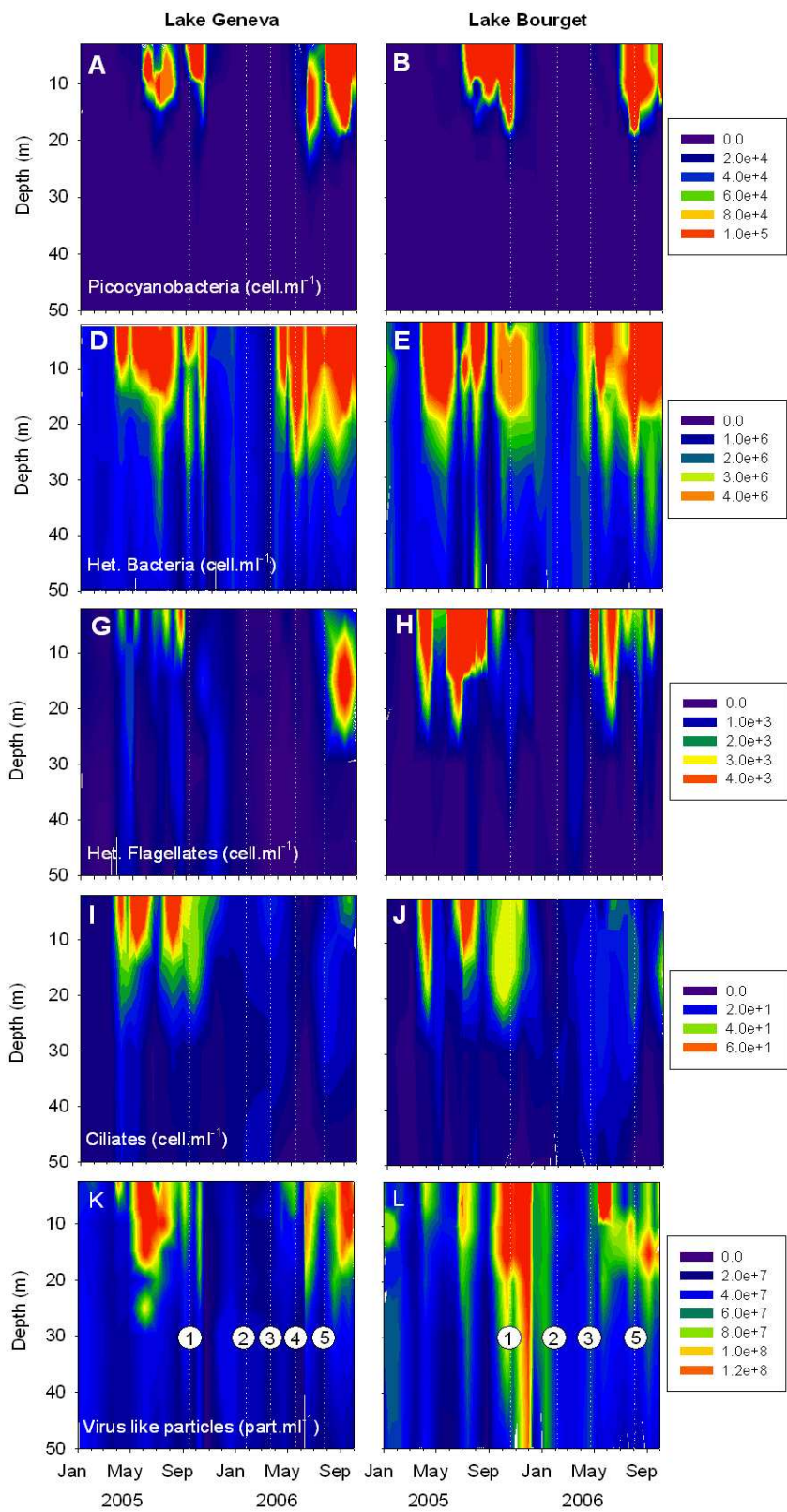


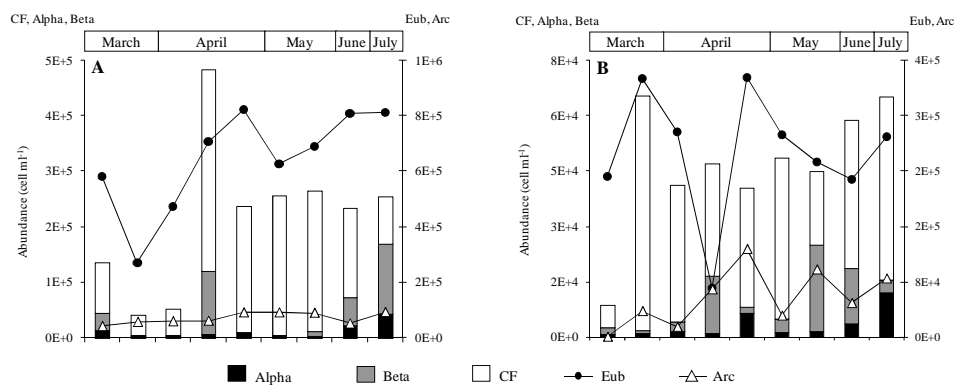
Fig 6 Dynamiques saisonnières des communautés microbiennes dans 2 lacs péri alpins  
Figure extraite de *Personnic et al 2009 (A14)*

Comme cela est illustré dans la figure 5b, la dynamique des ciliés planctoniques est, pour les lacs étudiés (Annecy, Léman, Bourget), clairement liée à celle des ressources (bactéries hétérotrophes ou picocyanobactéries). La part des principaux groupes taxonomiques de ciliés impliqués dans la bactériovorie est variable au cours du temps, mais les Oligotriches (le genre *Halteria* notamment) sont parmi les bactérivores les plus importants dans les transferts de matière micoplanctonique (en raison notamment de leur bonne capacité de filtration sur une large gamme de taille de particules allant de 0.2 à 5µm (Simek et al 2000)). Le second groupe d'importance dans ces transferts est représenté par les Prostomates (genre *Urotricha* notamment). Les liens existant entre les dynamiques des proies picoplanctoniques et des flagellés hétérotrophes se sont révélés moins directs et systématiques que ceux décrits pour les ciliés ; ceci est expliqué en partie par une diversité fonctionnelle mal décryptée chez les flagellés hétérotrophes.

➤ **Derrière une relative stabilité d'abondance, des changements de diversité et de structure à l'échelle des groupes taxonomiques et phylogénétiques**

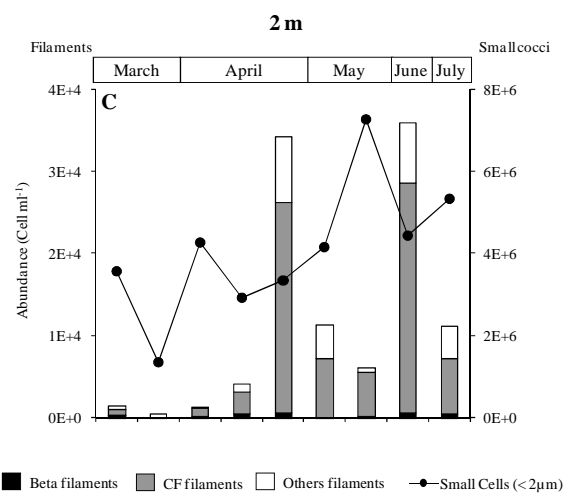
La distribution spatio-temporelle des communautés microbiennes n'a pas seulement été observée à l'échelle de groupes fonctionnels globaux (bactéries, protistes hétérotrophes) qui masquent une diversité phylogénétique et fonctionnelle importante ; mais, la diversité des populations composant ces assemblages bactériens ou eucaryotes a également été appréhendée à l'aide de méthodes moléculaires et, de manière plus classique, par des analyses de la structure en tailles des communautés.

D'une part, la méthode FISH (Fluorescence in situ Hybridization) a été utilisée afin de **cibler des groupes bactériens particuliers**. Des données concernant la dynamique de plusieurs groupes procaryotes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  proteobactéries, *Cytophaga flavobacteroides*, Actinobactéries, et Archae) ont notamment été acquises pour des échantillons du lac du Bourget. Ces résultats ont permis de révéler des changements dans la proportion de principaux groupes phylogénétiques bactériens.



*Fig 7 Seasonal changes in the abundance of the different phylogenetic bacterial groups at 2 m and 50 m depths: Alpha-proteobacteria (Alpha), Beta-proteobacteria (Beta), Gamma-proteobacteria (Gamma), and Cytophaga flavobacterium*  
*Illustration des changements temporels dans la proportion des groupes bactériens (Lac du Bourget) Figure extraite de Comte et al 2006 (A7)*

De plus à l'aide d'analyses d'images, la structure en taille des bactéries a été analysée, permettant de mettre en évidence l'apparition de formes de très petites tailles ( $< 0,4\mu\text{m}$ ) ou au contraire de formes filamenteuses ( $>2\mu\text{m}$ ). Ces changements de taille ont pu être rapportés à des changements de conditions en ressources nutritives, ou à des stratégies de résistance face à la prédation (A7). En effet, des évaluations taxon-spécifique des taux de broutage exercés par les bactérivores a été menée simultanément, afin de relier l'identité des bactérivores à ces changements de structure des communautés bactériennes (DEA J Comte). Les plus fortes proportions d'Eubactéries de petites tailles ( $<0,8\mu\text{m}$ ) apparaissent durant la phase des eaux claires au cours de laquelle un fort impact de prédation est exercé par les cladocères du genre *Daphnia* en particulier. La formation de filaments bactériens est plus particulièrement repérée en période de fort 'grazing' par les protistes hétérotrophes, et/ou de fortes disponibilités en ressources nutritives.



*Fig 8 Seasonal changes in the abundance of the different phylogenetic bacterial groups at 2 m depth*  
*Illustration des changements dans la structure en taille des bactéries hétérotrophes.*  
*Fig extraite de Comte et al 2006 (A7)*

En ce qui concerne les groupes microbiens eucaryotes, ne disposant pas initialement d'un panel de sondes spécifiques satisfaisant pouvant permettre de quantifier les divers groupes phylogénétiques, la technique T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism) a été choisie afin de décrire les **changements de diversité des groupes eucaryotes 'picoplanctoniques'** au cours de dynamique saisonnière. Dans ce travail réalisé au cours de la thèse de C Lepère, il s'est agit d'évaluer la diversité potentielle masquée à l'intérieur d'un ensemble d'organismes souvent mal identifié en microscopie (fraction planctonique  $< 5\mu\text{m}$ ) relativement homogène sur le plan morphologique mais susceptible de recéler une diversité cryptée. La méthode T-RFLP choisie pour la qualité des empreintes moléculaires (fragments de taille précise), pour la facilité de comparaison d'un grand nombre d'échantillons, ainsi que pour son aspect semi-quantitatif, a été utilisée pour l'analyse de la diversité des eucaryotes sur divers systèmes lacustres (lacs Pavin, du Bourget et réservoir de Villerest). Ces résultats ont permis de mettre en évidence une diversité relativement importante en terme de nombre d'OTU (operational taxonomic unit) et surtout de révéler des

changements temporels dans la structure des eucaryotes (<5µm) (A8). Ces variations sont observables non seulement dans la zone épilimnique ou métalimnique, mais également dans des zones hypolimniques plus stables en termes de conditions physico-chimiques (Fig 9).

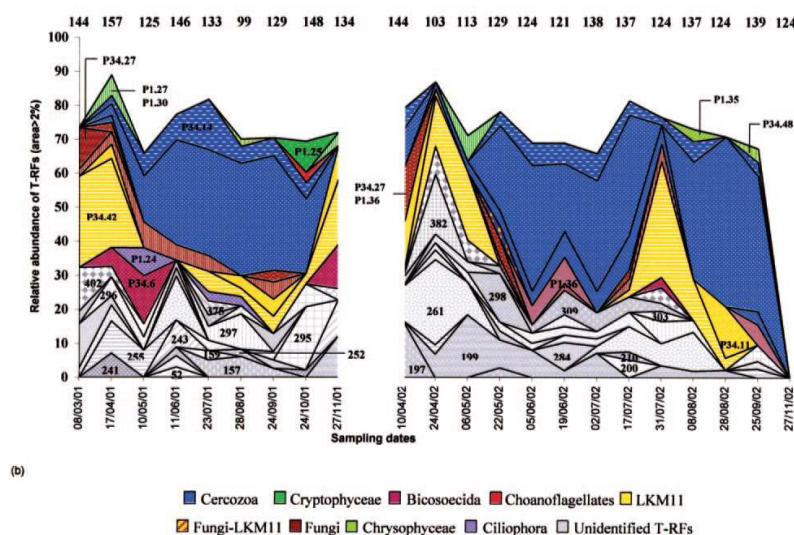


Fig 9. Seasonal variations, at 30-m (b) depths, in number and relative abundance of the various OTUs detected by T-RFLP analysis of 18S rRNA gene digestion by MspI, representing more than 2% of the total area (sampling date are expressed as day/month/year). The numbers at the top of the environmental T-RFLP profile represent the total number of T-RFs detected for each sampling date by the restriction enzyme MspI. Evolution temporelle de la composition des eucaryotes lacustres (fraction de taille <5µm-diversité révélée par T-RFLP). Fig extraite de Lepère et al 2006 (A8)

### ► Des dynamiques observables à l'échelle nyctémérale (échelle d'observation journalière)

Dans le souci de prendre en compte des échelles de temps différentes, et des pas de temps courts en cohérence avec le temps de développement des micro-organismes, les dynamiques de ces communautés microbiennes ont également été observées sur des pas de temps nyctéméraux. Dans le cadre du programme de DYLAChem (coordinateur: E. Viollier LGE Paris) les amplitudes de variations d'abondances ainsi que les interactions (taux de prédation, taux d'infection virale sur les bactéries) ont été étudiées au cours de deux cycles nyctéméraux qui nous ont permis de mettre en évidence (i) que malgré les facteurs de forçage (lumière, mouvements de la masse d'eau) les changements s'opérant au niveau des communautés microbiennes (production bactérienne, activités enzymatiques bactériennes) sont visiblement, à cette échelle de temps, fortement liées à des facteurs et interactions biotiques (A11) (ii) que les variations d'abondances et activités, observées à une l'échelle de temps plus large (saisonnière) sont significatives en regard des variations nyctémérales.

**Valorisation scientifique sous forme de publications : Comte et al. 2006 ; Domaizon et al. 2008 ; Sime Ngando et al. 2008 ; Personnic et al. 2009a.**

**Programme de recherche, financement :** ACI –FNS:ECCO : Projet VIRULAC-Projet DYLAChem (04- 06)

**Collaborations :** D Debroas et T Sime Ngando UMR CNRS 6023 Université Blaise Pascal

S Jacquet UMR CARTELE INRA Thonon les bains

## 1.2.2. Structure des réseaux trophiques microbiens et Estimation des flux trophiques

**Objectifs :** Ces études ont eu pour objectif de compléter les résultats obtenus par les approches systémiques, en faisant d'une part, un effort de quantification des flux trophiques ; et d'autre part, en explorant la diversité fonctionnelle potentiellement masquée au sein d'assemblages microbiens considérés comme étant homogènes (en terme de place trophique). Un effort d'analyse a également été fait pour détecter des interactions complexes souvent indirectes s'établissant entre les organismes microbiens.

### Principaux résultats :

- Sur la base d'observations in situ : Proposition d'un scénario pour les successions saisonnières au sein des réseaux trophique planctonique

Les résultats illustrés précédemment ont permis de relier les changements d'abondance et de structure des communautés virales, bactériennes, protistes à l'évolution des paramètres environnementaux affectant ces communautés. En conséquence, il a été possible, en particulier dans le cas du lac du Bourget, de proposer un schéma de fonctionnement du réseau trophique microbien (Fig 10) dans la zone épilimnique de ce lac, avec en particulier les changements s'opérant dans les voies de transfert trophique dominantes. Des hypothèses ont pu être émises concernant l'importance des facteurs de régulation ascendants et descendants (A7)

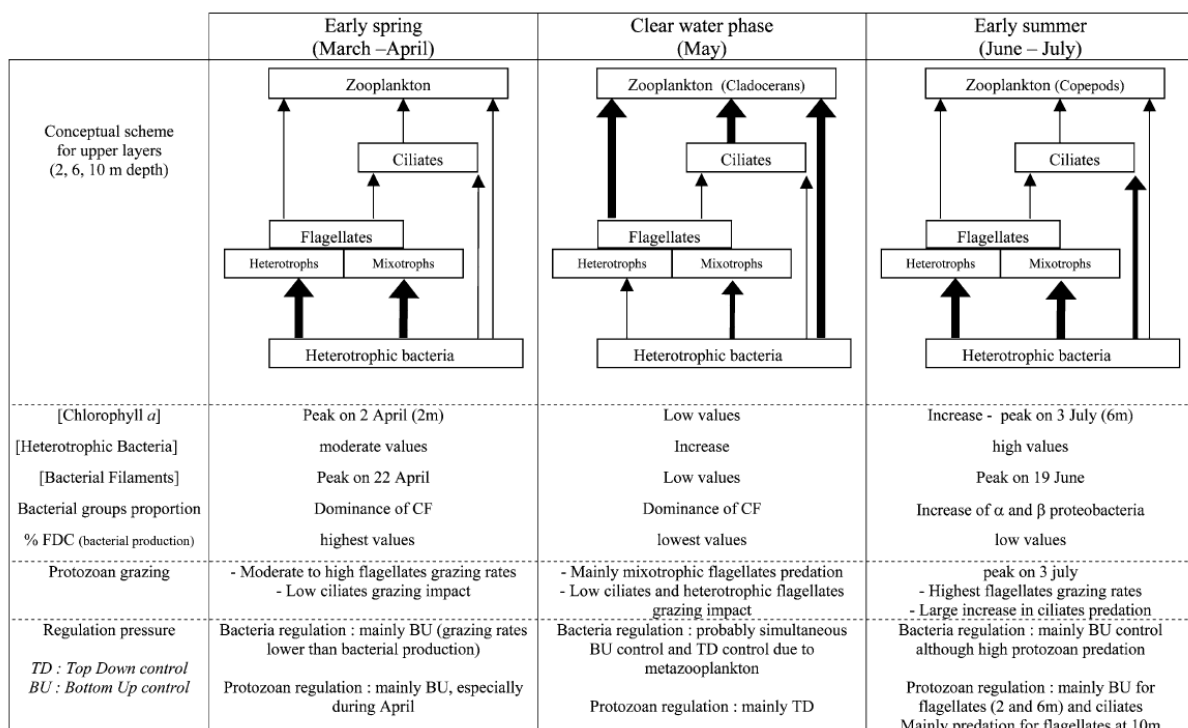
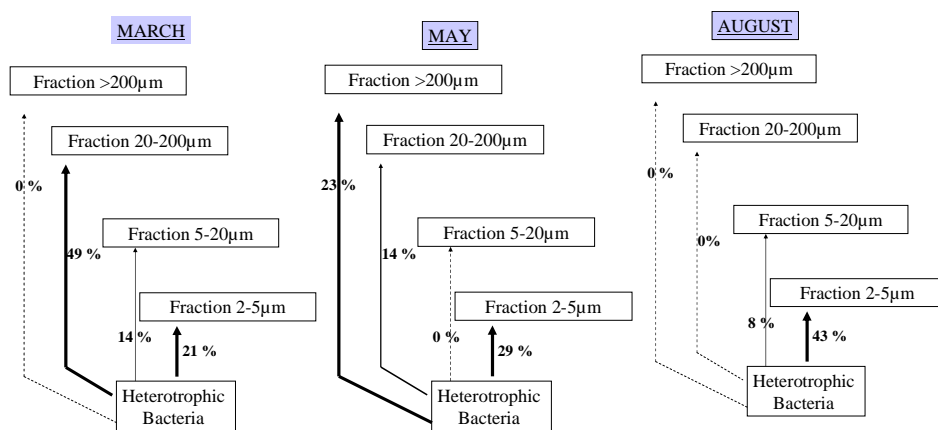


Fig 10 Conceptual scenario for the seasonal succession of bacterivores and of the microbial food web structure in upper layers (0–10m) of Lake Bourget between March and July 2002. Cf: cytophaga-Flavobacterium cluster. Schéma conceptuel du fonctionnement du réseau microbien pélagique Extrait de Comte et al. 2006 (A7)

Suite aux résultats et hypothèses formulés sur la base des données de suivis écosystémiques, des approches expérimentales *in situ* (basées sur le fractionnement des communautés) ont permis de confirmer les changements saisonniers dans les voies de transfert et de régulation de la boucle microbienne et, surtout de quantifier les transferts trophiques entre les compartiments bactériens et les différents groupes fonctionnels bactériovores. Ainsi, la connaissance des divers liens trophiques et des taux de prédation exercés par les différentes classes de tailles planctoniques a pu être affinée (Fig 11).



*Fig 11. Changement saisonnier dans les voies trophiques : Mortalité bactérienne (% de production bactérienne) imputable aux différentes classes de taille planctoniques (zone épilimnique du lac du Bourget) Domaizon et al en prep.*

A l'issu des expérimentations basées sur le fractionnement des communautés, il apparaît clairement que :

- (i) Le nombre de liens trophiques varie au cours du temps
- (ii) L'importance relative des divers groupes de prédateurs dans la régulation du bacterioplancton est variable au cours du temps : On observe généralement un fort impact de la fraction <math>< 5\mu\text{m}</math> (flagellés bactériovores), mais les bactéries représentent toujours une ressource directe pour d'autres compartiments planctoniques (rotifères, Daphniidae notamment).
- (iii) Les processus Top Down (prédation) structurent les communautés de bactéries hétérotrophes et flagellés, en termes d'abondance, structure en taille, et diversité génétique. Des modifications de la richesse eubactérienne, visibles via des techniques d'empreinte génétique, sont fonction de l'identité et de l'activité des bactériovores. Les effets de type cascade trophique sont difficilement repérables au sein des réseaux trophiques microbiens (en comparaison des réseaux herbivores : phytoplancton – zooplancton- poissons). Ces effets cascades au sein des réseaux microbiens sont variables en fonction des périodes d'études et sont 'brouillés' par la présence d'organismes omnivores.

**Valorisation scientifique sous forme de publications : Comte et al. 2006 ; Domaizon et al. 2008. ; Domaizon et al en prep. + Communications à colloques**

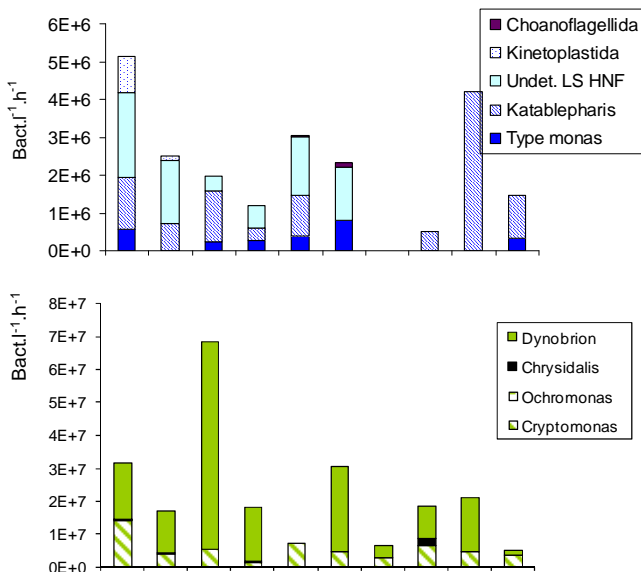
### 1.2.3 Mise en évidence d'Interactions biotiques peu prises en compte dans les réseaux trophiques microbiens

**Objectifs:** L'objectif a été ici d'explorer la diversité fonctionnelle potentiellement masquée au sein d'assemblages d'organismes considérés comme étant homogènes en termes de 'place' trophique. Un effort d'analyse a également été fait pour détecter des interactions complexes souvent indirectes s'établissant entre les organismes microbiens.

#### ➤ Mise en évidence de l'importance des mixotrophes en tant que groupe fonctionnel

Par une Approche taxon-spécifique des communautés bactériovores, lors d'un suivi des communautés microbiennes effectuées sur le lac oligotrophe d'Annecy, comprenant des mesures d'abondances, de production ainsi que des évaluations de taux de filtration exercés par les divers taxa bactériovores, les objectifs principaux ont été ici d'évaluer (1) l'importance relative des différents taxa (ciliés et flagellés) dans la régulation des bactéries hétérotrophes (2) les changements saisonniers dans la pression de prédation taxon spécifique.

Les résultats obtenus mettent en évidence les changements saisonniers dans les taux d'ingestion de nombreux taxa (flagellés et ciliés), par ailleurs, l'accent est mis sur l'importance que peuvent avoir les espèces mixotrophes en tant que bactériovores (en particulier dans les systèmes oligotrophes) représentant ainsi un lien potentiellement important dans les flux au sein des réseaux trophiques planctoniques. Cette étude souligne l'intérêt de définir des groupes fonctionnels pertinents pour progresser dans la

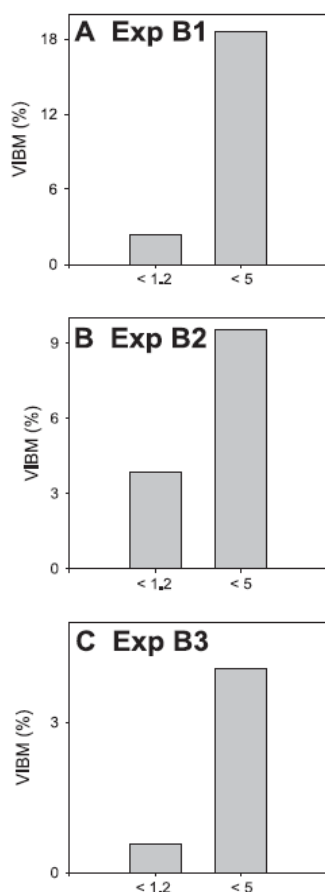


compréhension des flux de carbone, l'identification, et parmi ces groupes fonctionnels, les protistes mixotrophes doivent être repérés tout particulièrement dans les systèmes oligotrophes, ou en période de déplétion en nutriments (en zone épilimnique en été dans les lacs mésotrophes) (A3).

*Fig12. Taux de 'grazing' mesurés dans la zone épilimnique du lac d'Annecy (méthode d'ingestion des billes fluorescentes) par les flagellés non pigmentés et pigmentés. Figure extraite de Domaizon et al 2003 (A3)*

➤ Mise en évidence d'interactions indirectes de l'activité de prédation : *synergie virus-bactérovores*

Plusieurs approches expérimentales ont été réalisées par fractionnement de communautés afin de constituer des assemblages planctoniques simplifiés en vue d'isoler les effets de certaines interactions biotiques (prédation, lyse virale, excrétion ...). Parmi ces expérimentations, l'une d'elle a eu pour objectif d'évaluer l'importance de la présence des prédateurs flagellés sur les interactions virus-bactéries (taux



d'infection et mortalité bactérienne). La mortalité bactérienne induite par les virus a été comparée en présence et absence de flagellés hétérotrophes (<5μm) considéré comme étant les principaux bactérovores, et ceci au cours de 3 séries expérimentales. Les résultats mettent systématiquement en évidence un plus fort effet régulateur des virus en présence des prédateurs bactérovores (A10). Ces résultats ont permis de révéler des actions synergiques entre l'effet de broutage et la mortalité bactérienne induite par les virus. Ces effets synergiques sont liés à des effets en cascades impliquant (1) la redistribution de ressources nutritives accélérée en présence de prédateurs (2) des modifications de structure en taille, d'activité, et de diversité des communautés microbiennes.

Fig 13 Pourcentage de mortalité bactérienne induite par la lyse virale (VIBM) en absence (<1,2μm) et en présence (<5μm) des prédateurs bactérovores (mars Avril Mai – Lac du Bourget épilimnion) **Figure extraite de Jacquet et al (2007) (A10)**

**Valorisation scientifique sous forme de publications** : Domaizon et al. 2003 ; Jacquet et al. 2007 + Communications à colloques  
**Programme de recherche et financement** : participation au programme Plan Etat Région : Fonctionnement trophique du lac d'Annecy (Resp . D gerdeaux).  
**Collaborations** : T Sime Ngando UMR CNRS 6023 Université Blaise Pascal Clermont II



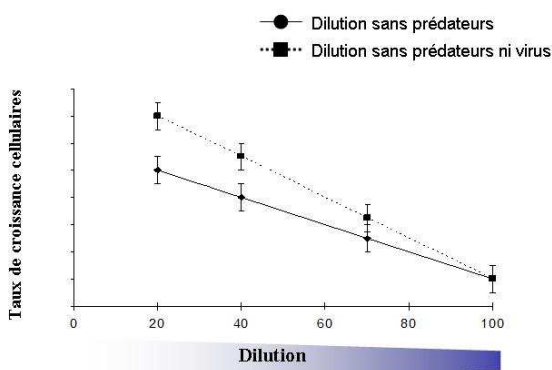
### 1.2.4 Facteurs de régulation s'exerçant sur les communautés picoplanctoniques

Contexte - objectifs : Nous connaissons encore aujourd'hui trop peu les mécanismes structurant les réseaux trophiques microbiens pour pouvoir pleinement comprendre la dynamique spatiale et temporelle des divers groupes fonctionnels microbiens et pour pouvoir prédire leurs réponses face aux changements environnementaux. Il est admis que des facteurs de type bottom-up et top down affectent simultanément les communautés planctoniques mais leur part relative est encore largement discutée (Thingstad, 2000). Parmi les facteurs descendants, les virus, les flagellés hétérotrophes et les ciliés sont considérés comme les principaux régulateurs des communautés bactériennes dans les écosystèmes aquatiques (Simek et al, 2000, 2001, Pradeep-Ram et al, 2005), mais le zooplancton métazoaire peut également constituer un facteur de régulation important (Work & Havens 2003 ; Vrede & Vrede 2005). Par ailleurs, depuis les travaux de Fuhrman & Noble (1995), on estime que la mortalité bactérienne engendrée par la lyse virale et le « broutage » par les flagellés hétérotrophes peuvent être comparable et que ces deux processus représentent en fait les deux principales forces responsables de cette mortalité. A l'aide d'approches expérimentales les travaux illustrés ci après ont eu pour objectif d'estimer la part des certains de ces facteurs de régulation (lyse virale et prédation bactériennes) ainsi que leur variabilité temporelle.

#### Principaux résultats :

##### ➤ Importance relative des prédateurs et des virus dans la régulation des communautés bactériennes

Des approches expérimentales *in situ* ont été réalisées en microcosmes, à différentes périodes de l'année dans les trois lacs périalpins (Annecy Léman Bourget), afin d'estimer la part relative de la prédation par les flagellés hétérotrophes et de l'impact des virus sur la mortalité bactérienne. La méthode mise en application ici est dérivée de la technique de dilution initialement proposée pour évaluer l'impact du



broutage des organismes zooplanctoniques sur le micro-phytoplancton (>20 µm). Les échantillons d'eau fractionnée (ne contenant que les communautés virales, bactériennes, protistes flagellés) sont soumis à des dilutions successives en présence (eau filtrée sur 0,2µm) ou absence (eau filtrée sur 100kDa) de la communauté virale (voir schéma ci-contre). Les taux de croissance bactériens

sont observés dans les différents traitements, permettant d'évaluer le poids de la régulation par les prédateurs seuls, ou par l'effet conjoint des prédateurs et virus.

Les résultats obtenus lors de 14 séries expérimentales, mettent en évidence que la lyse virale associée à la prédation par les flagellés hétérotrophes peut être responsable d'une part importante de la mortalité bactérienne allant jusqu'à 71% en été (Lac Léman). Toutefois, l'impact de la lyse virale, seul, ne dépasse que très rarement le poids régulateur de la prédation s'exerçant sur les bactéries hétérotrophes. De plus les effets synergiques entre présence des protistes flagellés et infection virale, qui avaient été soulignés lors de mesures plus ponctuelles sont confirmés par les résultats acquis lors de ces expérimentations répétées. Par ailleurs une importante variabilité saisonnière est observée dans l'impact de régulation exercée par les bactérivores flagellés et par la lyse virale (A6, A13, B1) ; ces variations saisonnières sont cohérentes avec les hypothèses émises lors des suivis *in situ* de la dynamique des communautés.

➤ **Effets structurants de la prédation sur les communautés bactériennes – Estimation de l'importance relative des effets top down et bottom up**

**Effets de la prédation : régulation d'abondance, prédation sélective, et impact sur la diversité**

Des microcosmes (sacs de dialyse) incubés *in situ* ont été utilisés pour des expérimentations de fractionnement des communautés (< 0,8µm ; <2µm, <20µm, <200µm, fraction totale) afin d'estimer ainsi la pression de régulation exercée par un assemblage planctonique de plus en plus complexe sur les bactéries hétérotrophes. Ces expérimentations de courtes durées (5 jours) permettent de suivre l'évolution journalière de l'abondance, l'activité (mesure de production) et la diversité bactérienne (FISH ; DDGE).

Ces expérimentations ayant été répétées à des périodes différentes, des changements saisonniers ont pu être détectés dans le type d'effets structurants obtenus. L'effet structurant des prédateurs apparait clairement au niveau des changements de profils de diversité (DGGE) : la présence des bactérivores les plus efficaces se traduisant par un maintien de la diversité bactérienne. Le caractère sélectif que peut prendre la prédation en induisant une mortalité spécifique de certains morphotypes et/ou génotypes bactériens est également observé (Domaizon et al en prep).

**Importance relative des effets top down et bottom up**

Afin de tester l'effet respectif et conjugué du niveau de ressources (apports plus ou moins élevés en éléments nutritifs azotés et phosphorés) et du niveau de prédation (absence / présence de prédateurs planctoniques), Un plan expérimental factoriel croisant les deux facteurs a été mis en oeuvre en microcosmes (*in situ*). Les effets structurants ont été observés sur la diversité bactérienne par utilisation de méthodes moléculaires. Les résultats obtenus montrent que la composition de la communauté bactérienne est sous la dépendance simultanée de la qualité des substrats organiques (eux même affectés par la

composition phytoplanctonique) et de la prédation sélective exercée par les bactérivores (protistes, ou métazooplancton) (A5).

Sur le même principe, lors d'approche en mésocosmes (réservoir de Villerest France) permettant de croiser des effets d'apports en nutriments et des niveaux de prédation (présence / absence de poissons planctivores), l'évolution de l'ensemble des communautés planctoniques a été suivie. Des effets structurants significatifs 'bottom up' ont été enregistrés sur l'abondance bactérienne et phytoplanctonique, mais également jusqu'au prédateurs zooplactoniques de petite taille (via des effets en cascades). Alors que les effets liés à la prédation ont été enregistrés notamment sur des paramètres de diversité (diversité 'picoplanctonique' notamment). Des effets d'interactions significatifs ont également pu être observés entre les deux types de facteurs structurants (Tableau 1 ; A9).

Response variable	ANOVA results		
	N (Nutrients)	F (Fish)	interaction FxN
Bacteria ( $10^6$ cells $ml^{-1}$ )	<b>0,010 (+)</b>	NS	<b>0,020</b>
Chl <i>a</i> ( $\mu g l^{-1}$ )	<b>0 (+)</b>	NS	0,257
Zooplankton (ind $l^{-1}$ )	NS	NS	
Large size cladocerans (Ind $l^{-1}$ )	NS	<b>0,010 (-)</b>	0,153
Small size cladocerans (Ind $l^{-1}$ )	<b>0,001 (-)</b>	NS	0,256
Copepods (Ind $l^{-1}$ )	NS	NS	
Rotifers (Ind $l^{-1}$ )	NS	NS	
Phytoplankton ( $10^5$ cells $ml^{-1}$ )	<b>0,001 (+)</b>	NS	0,156
total flagellates ( $10^4$ cells $ml^{-1}$ )	NS	<b>0,003 (-)</b>	<b>0,010</b>
PF ( $10^4$ cells $ml^{-1}$ )	NS	<b>0,050 (+)</b>	<b>0,040</b>
HNF ( $10^4$ cells $ml^{-1}$ )	NS	NS	
Ciliates ( $10^3$ cells $l^{-1}$ )	NS	<b>0,050 (+)</b>	<b>0,010</b>
PF < 5 $\mu m$ ( $10^3$ cells $ml^{-1}$ )	< <b>0,001 (+)</b>	< <b>0,001 (+)</b>	< <b>0,001</b>
HF < 5 $\mu m$ ( $10^3$ cells $ml^{-1}$ )	NS	NS	
T-RFs numbers	NS	<b>0,003 (-)</b>	<b>0,006</b>
Shanon and Weaver indice	<b>0,040 (-)</b>	<b>0,017 (-)</b>	<b>0,004</b>

*Tableau 1. Effet des facteurs bottom-up top-down manipulés (test par ANOVA à deux facteurs) extrait de Lepère et al 2007 (A9)*

*PF : flagellés pigmentés - HF : flagellés hétérotrophes ; T-RFs : nombre d'OTUs 'picoeucaryotes' obtenus en T-RFLP ; Shannon et Waewer : Indice de diversité estimée à partir des % d'OTUs (T-RFLP)*

**Valorisation scientifique sous forme de publications : Jardillier et al. 2004. ; Jacquet et al. 2005 ; Duhamel et al 2006 ; Lepère et al 2007 ; Personnic et al. 2009 ; Domaizon et al. en prep.**  
**Programme de recherche et financement : programme national/ACI –FNS:ECCO : VIRULAC et programme national ANR Biodiversité AQUAPHAGE**  
**Collaborations : S Jacquet U Dorigo UMR CARRTEL INRA Thonon les bains D Debroas - T Sime Ngando UMR CNRS 6023 Université Blaise Pascal Clermont II**

## 2. DIVERSITE PHYLOGENETIQUE DES EUKARYOTES UNICELLULAIRES LACUSTRES

L'utilisation d'outils moléculaires (méthodes d'empreintes moléculaires et de clonage-séquençage, marquage FISH) a permis récemment d'apporter une vision nouvelle sur la diversité des assemblages microbiens, notamment dans la fraction planctonique de très petite taille (<5µm). Les résultats illustrés dans cette partie concernent plus particulièrement les groupes phylogénétiques eucaryotes détectés en milieu lacustre. La présentation de ces résultats (§2.2) est précédée d'un rappel concernant le contexte scientifique global.

### 2.1 Des protistes aux eucaryotes unicellulaires : Classification - Notion d'espèces-Outils moléculaires. Contexte scientifique

#### Classification :

Les protistes, ou unicellulaires eucaryotes, sont parmi les premiers micro-organismes qui ont été observés et décrits par Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) le fondateur de la bactériologie et de la proto-zoologie. Les protistes, eucaryotes unicellulaires, sont caractérisés par une grande diversité morphologique et par des architectures cellulaires variées qui ont permis de procéder aux 1<sup>ères</sup> constructions phylogénétiques.

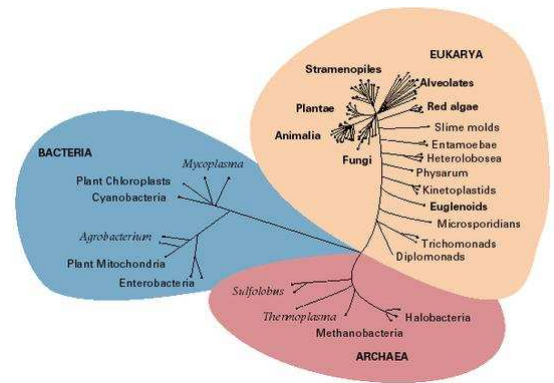


Fig 14 Arbre phylogénétique de l'ensemble du vivant d'après Woese (1987)

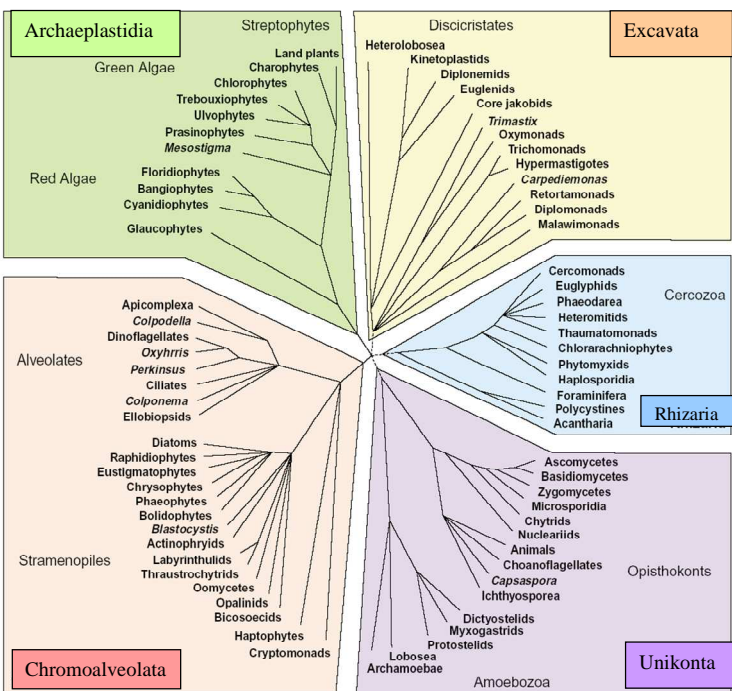


Fig 15 Arbre phylogénétique des principaux groupes eucaryotes d'après Keeling et al. 2005 modifié

Les phylogénies moléculaires ont ensuite, et vont encore apporter des compléments ou des réorganisations majeures dans la classification de ces organismes. Au début des années 90, les analyses phylogénétiques des gènes codant pour la sous unité de l'ARN ribosomal ont permis de réorganiser l'arbre du vivant en trois grands domaines (Bactéries, Archaea, Eucaryotes -Woese, 1987- Fig 14), puis, au cours de la dernière décennie, plusieurs arbres phylogénétiques ont été produits pour les organismes

eucaryotes à partir de données moléculaires. En 2005, Keeling et ses collaborateurs proposent un arbre qui présente les principaux groupes eucaryotes, et permet souligner l'importance des micro-organismes dans la diversité eucaryote, puisque les micro-organismes (et notamment les représentants du plancton) sont présents dans quasiment tous les grands groupes constituant cet arbre (Fig 15). Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, des pico- nano-eucaryotes peuvent être répertoriés dans: les Opisthokonta, les Chromalveolata (Alveolata et Straménopiles), les Rhizaria ainsi que dans les Archaeplastidia.

Les techniques de biologie moléculaire, et en particulier de séquençage, d'abord utilisées pour l'étude des procaryotes (en ciblant le 16S) sont appliquées aux pico- nano- et micro- eucaryotes (ciblage du 18S) depuis quelques années dans des environnements divers (e. g. Moon van der Stay et al, 2001; Lopez-Garcia et al, 2001; Not et al, 2005; Behnke et al, 2006), mais beaucoup plus rarement en milieu lacustre. Ces méthodes qui permettent d'identifier les micro-organismes, en s'affranchissant des étapes de mise en culture ont permis de révéler une diversité insoupçonnée ou mal décryptée par les techniques d'observations microscopiques. De nouveaux phylotypes ont été révélés, notamment en milieu marin, parmi les groupes des stramenopiles et alveolés.

La phylogénie des unicellulaires eucaryotes est un domaine en forte évolution, quelques exemples récents mettent en évidence une possible sous estimation de la diversité par l'analyse de 18S (Palenik et al 2007), les gènes marqueurs les plus utilisés pour construire la phylogénie eucaryote sont encore les séquences de la petite sous unité 18S (Richards et al, 2005), et dans une moindre mesure celle de la grande sous unité 28S (Amato et al, 2007) et des régions intergéniques ITS (Medlin et al, 2006 ; Amato et al, 2007).

### **Concept d'espèces et aspects biogéographiques :**

De nombreux protistes semblent avoir une distribution ubiquiste, pouvant être recensés dans des écosystèmes très divers à l'échelle de la planète. Toutefois, ce constat est source de vifs débats (Fenchel & Finlay 2004 ; Finlay & Fenchel 2004 ; Foissner 2006 ; Caron 2009). Les discussions concernant la répartition biogéographique des protistes sont assez semblables à celles qui traitent de la distribution des bactéries. Le concept : 'Evrything is evreywhere but the environment selects' est fortement soutenu par certains microbiologistes mais également fortement réfutés par d'autres. Cette hypothèse nécessiterait l'existence d'un pool de gènes communs présent partout et qui, aujourd'hui, n'est pas définitivement démontré. Des études récentes remettent en cause le 'cosmopolitisme' de ces organismes, et les techniques émergentes de séquençage haut débit qui aujourd'hui se démocratisent apportent un début de réponse concernant les communautés bactériennes notamment avec les travaux de Sogin et al (2006) et Mou et al (2008). Ces approches et méthodes trouvent aujourd'hui leur place dans les recherches en écologie des protistes, domaine dans lequel ces méthodes améliorent notre capacité à générer et tester des hypothèses

concernant notamment la biogéographie des micro-organismes. L'hypothèse du Tout est partout pourrait être liée à la difficulté de distinguer des espèces cryptiques (espèces de même morphotype mais comportant des souches différentes, possédant des capacités physiologiques différentes et des incompatibilités d'interfécondité). Une question centrale dans ces débats ubiquisme / endemisme est le concept plus ou moins 'flou' d'espèces pour les protistes. En effet, la définition de l'espèce biologique selon laquelle 'une espèce est un groupe d'organismes interféconds qui sont génétiquement isolés d'autres groupes similaires' est une définition difficilement applicable aux micro-organismes ayant un mode de reproduction clonal, ou, s'il est sexué, l'interfécondité est rarement mise en évidence pour des organismes que l'on ne sait pas maintenir en culture pour la plupart. En ce qui concerne les protistes, le concept qui leur est le plus souvent associé est celui d'espèce morphologique ou morphotype basé sur des critères de ressemblances et de différences au niveau morphologique et pigmentaire. Même si la phylogénie des eucaryotes a pu progresser grâce à l'apport de la microscopie électronique, les caractères ultra-structuraux permettent rarement d'atteindre le niveau de distinction de l'espèce. De plus la morphologie ne permet pas d'établir les relations phylogénétiques qui peuvent exister entre les différents groupes décrits. Ceci est tout particulièrement le cas pour les protistes de très petite taille (<5µm) pour lesquels un pourcentage élevé de cellules sont déterminées de façon incertaine sur la base de leur morphologie. Les exemples d'espèces cryptiques ou pseudo-cryptiques<sup>3</sup> sont assez fréquentes au sein des protistes, mais plus particulièrement du phytoplancton (Šlapeta et al, 2006b ; Amato et al, 2007 ; Amato & Montresor 2008). Il apparaît que la seule base des critères morphologiques ne suffit pas à aborder la question d'évaluation de la diversité des protistes, et l'outil moléculaire apporte ici un éclairage précis qui explique que la taxonomie et la biogéographie des micro-organismes eucaryotes soient des domaines en forte évolution.

### **Intérêts des approches moléculaires appliquées à l'étude des pico-eucaryotes lacustres**

L'assemblage des pico-eucaryotes (correspondant *sensu stricto* aux cellules < à 2-3µm d'après Stockner & Antia (1986) cette limite de taille étant élargie jusqu'à 5µm selon les études) est constitué de cellules pigmentées photo-autotrophes, de cellules hétérotrophes (essentiellement phagotrophes bactérivores, également osmotrophes, parasites) ainsi que de cellules potentiellement mixotrophes.

Les rôles fonctionnels des picoeucaryotes sont donc divers et importants dans l'organisation des communautés et la productivité des systèmes pélagiques, or, malgré l'intérêt porté depuis plus d'une décennie au fonctionnement de la boucle microbienne lacustre, les données disponibles concernant la diversité et la distribution des eucaryotes unicellulaires lacustres, en particulier les eucaryotes de très

---

<sup>3</sup> Espèces décrites comme morphologiquement identiques, mais séparés en groupes génétiquement distincts (Knowlton 1993)

petite taille (<5µm) sont toutefois peu nombreuses. Les études ont longtemps été centrées sur le nanoplancton (taille 3 à 20 µm). L'analyse de la composition de cet assemblage a été prioritairement appréhendée par des méthodes de microscopie classiques utilisant des fluorochromes tels que le DAPI et la Primuline. Si l'utilisation de la microscopie à épifluorescence a permis d'avoir une bonne estimation de l'abondance des communautés dans les échantillons naturels, il n'en reste pas moins que cette méthode n'a pas donné des informations taxonomiques précises. Il existe de nombreux flagellés dont la position taxonomique est incertaine en raison d'une similitude morphologique pouvant masquer une diversité phylogénétique et fonctionnelle. La notion d'espèces cryptiques s'applique particulièrement bien à cet exemple des 'pico'eucaryotes lacustres. Ces cellules sont en effet souvent regroupées dans une « boîte noire » au sein de laquelle les cellules non identifiées sont dominantes et généralement sont de taille inférieure à 5µm. L'outil moléculaire s'est donc révélé être un outil particulièrement utile pour éclairer la diversité recélée dans ce compartiment.

## **2.2 'Pico'eucaryotes (< 5µm) dans les écosystèmes lacustres : une diversité nouvellement révélée par les outils moléculaires**

### Objectifs :

Si l'apport de la biologie moléculaire a depuis longtemps contribué à la connaissance et à la mise en évidence des procaryotes (Giovannoni et al 1988) ce n'est que plus récemment que des techniques moléculaires ont été appliquées aux protistes, avec pour objectif de mieux définir ces populations eucaryotes et notamment celles constituant l'assemblage de très petite taille, le picoplancton (Guillou et al, 1999), et ceci surtout en milieu marin. Dans les milieux aquatiques les travaux menés en collaboration avec le laboratoire LMGE (ex laboratoire de Biologie des Protistes Clermont II) nous ont permis d'acquérir l'essentiel des données aujourd'hui disponibles concernant la composition phylogénétique des petits eucaryotes planctoniques.

Les approches écosystémiques mises en place notamment dans le cadre de la thèse de C Lepère, ont eu pour but l'étude de la composition, de la dynamique et des facteurs de régulations du 'pico'plancton eucaryote (limite de taille considérée : <5 µm). La méthode moléculaire de clonage séquençage a été utilisée pour la caractérisation des différents clades, de plus, cette méthode a été couplée à la technique de T-RFLP pour étudier la dynamique saisonnière de la communauté picoeucaryotique. Enfin, la méthode TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification-Fluorescent In Situ Hybridization) a été utilisée pour identifier et quantifier des groupes eucaryotes ciblés.

### Principaux résultats :

L'analyse de la composition de la communauté picoeucaryotique, réalisée dans plusieurs systèmes lacustres différant par leur statut trophique, leur taille, leur morphologie et leur géographie, a permis d'obtenir une première estimation de la diversité de ces microorganismes et une première caractérisation de clades lacustres (Fig 16abcd). L'étude de leur dynamique, au cours de deux années consécutives dans un lac oligo-mésotrophe, a permis d'observer l'évolution saisonnière et les relations s'établissant entre les variations spatio-temporelles de la structure des picoeucaryotes et celles des facteurs environnementaux susceptibles de les réguler (A8). Ces travaux ont révélé une grande diversité (variété de groupes phylogénétiques) parmi ces cellules de petite taille difficilement identifiables lors des observations en microscopie. La richesse et la diversité les plus élevées ont été observées dans les lacs de statut trophique intermédiaire (lac mésotrophe). A l'issue de ce travail, il apparaît toutefois que les écosystèmes étudiés présentent des spécificités communes. En effet, leur communauté picoeucaryotique est toujours dominée par un faible nombre de taxons, en moyenne, sur les sites étudiés, 8 T-RFs représentent plus de 60% de l'aire totale, et la majorité des séquences lacustres obtenues sont affiliées à des groupes hétérotrophes (84% des séquences). Parmi ces organismes hétérotrophes, on note, l'importance des séquences affiliées à des groupes parasites, notamment les Champignons (jusqu'à 25% des séquences) et les Perkinsozoa (en moyenne 15% des séquences) (A12). Les séquences affiliées à des picoeucaryotes pigmentés sont très peu nombreuses et essentiellement représentées par les Cryptophyta. Cependant, les résultats de dénombrement par la méthode TSA-FISH suggèrent une sous-estimation des pigmentés et en particulier des Chlorophyceae par les méthodes moléculaires (PCR) (A12).

Des comparaisons avec les groupes recensés en milieux marins ont pu être établies, ainsi, il apparaît que les nouveaux clades définis dans les écosystèmes océaniques (Stramenopiles et Alveolata) ne sont pas présents dans les écosystèmes lacustres.

**Valorisation scientifique sous forme de publications : Lepère et al 2006 ; Lepère et al 2008**

Programme de recherche et financement : programme national EC2CO INSU 2006-2009

Collaborations : D Debroas UMR CNRS 6023 Université Blaise Pascal Clermont II

Ci après , Fig 16 abcd : Arbres phylogénétiques des Cryptophytes, Cercozoa, Centroheliozoa, Opisthokonts, Alveolates, Stramenopiles, illustrant la diversité des groupes eucaryotes recensés lors deux points de clonage-séquençage effectués dans la Lac du Bourget (épilmnion – Fraction <5µm)- Extraits de Lepère et al (2008 - A12)



Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences : Sequences derived from our study in Bourget lake are highlighted in bold face. In brackets are the names of the lakes in which each sequence was identified.



Fig 16 a Phylogenetic tree of Alveolates. Extrait de Lepère et al 2008

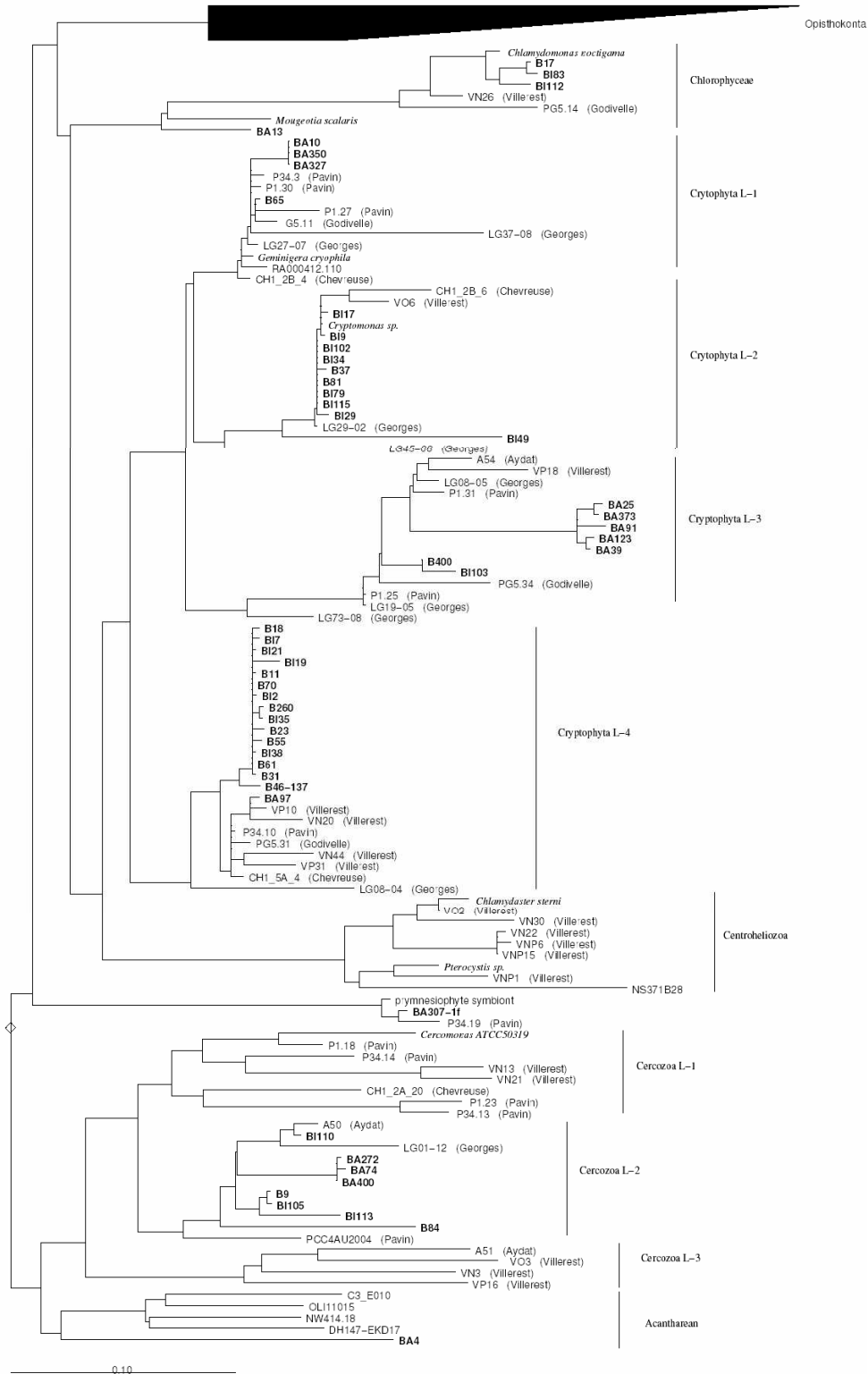


Fig 16b Phylogenetic tree of SSU rDNA sequences covering the diversity of Cryptophytes, Cercozoa, and Centrohelioczoa. Extrait de Lepère et al 2008

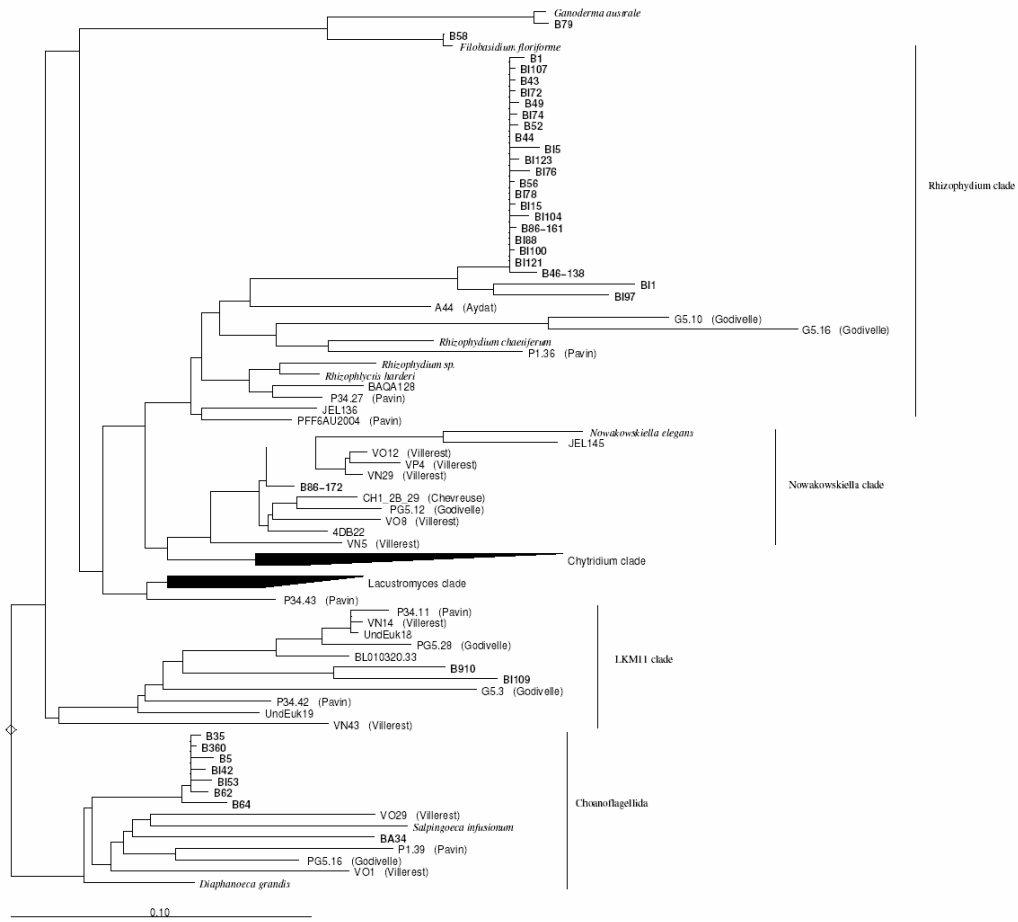


Fig 16c Phylogenetic tree of Opisthokonts. Extrait de Lepère et al 2008

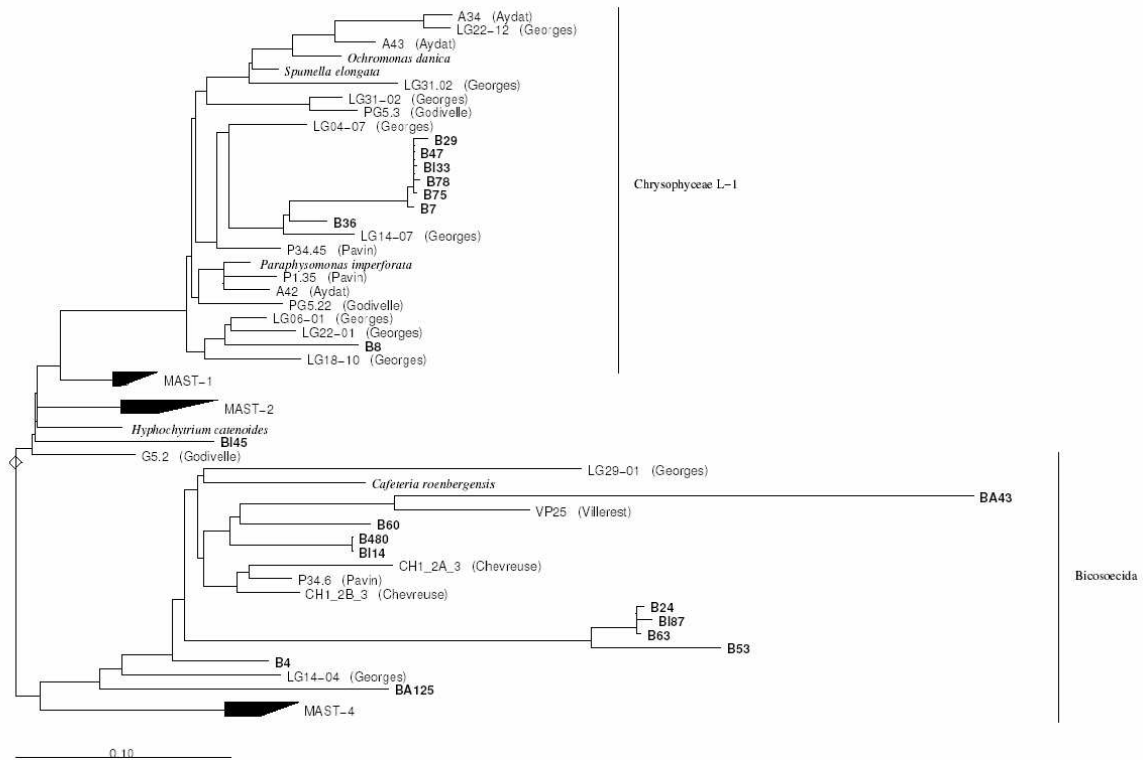


Fig 16d Phylogenetic tree of Stramenopiles. Extrait de Lepère et al 2008

## 2.3 Facteurs de contrôle de la structure des 'pico'eucaryotes (ici <5µm)

Des approches expérimentales menées en mésocosmes illustrent ci après les travaux menés afin d'identifier l'effet de certains facteurs de régulation tels que, la structure des prédateurs planctoniques, l'augmentation des ressources (N,P essentiellement), de la température, des radiations UV, sur la diversité des plus petits eucaryotes unicellulaires. Les études présentées ci après ont été généralement construites sur la base de 'design' expérimentaux basés selon des plans factoriels croisant 2 à 3 facteurs manipulés.

### ➤ Importance des facteurs Bottom Up et Top Down

#### Objectifs :

En parallèle de l'analyse de la composition de l'assemblage des petits eucaryotes (<5µm) en milieu lacustre hyper-eutrophe, l'objectif de ces travaux a été de coupler au suivi *in situ*, une expérimentation visant à évaluer l'importance relative des effets structurants Top-down et Bottom-up sur la diversité des pico-eucaryotes. Le schéma expérimental utilisé était un plan factoriel croisant deux facteurs (apports en éléments nutritifs (N, P) et présence/absence de poisson planctonophages) qui a été réalisé en mésocosmes (remplis avec l'eau de la retenue eutrophe de Villerest-France). La diversité phylogénétique des eucaryotes a été appréhendée par la méthode d'empreinte moléculaire T-RFLP et par clonage séquençage des fragments de PCR obtenus par amplification des gènes de l'ARNr 18S. Les changements s'opérant dans la composition de l'assemblage eucaryote ont été confrontés à l'évolution des paramètres biotiques (abondance des bactéries, virus, nano-flagellés, ciliés, nano- et micro-phytoplancton, metazooplancton) afin de mettre en évidence des liens de régulation directs ou indirects.

#### Principaux résultats

Le suivi réalisé *in situ* met en évidence des changements marqués dans les taxa (T-RFs) dominants au cours du temps, ces modifications sont significativement liées à des paramètres tels que les teneurs en éléments nutritifs (N, P) et la composition du metazooplancton. Parallèlement, il est confirmé par l'approche expérimentale que, en fonction du type de traitements expérimentaux (absence/présence de poissons, et, faibles/forts apports en azote et phosphore), des modifications s'opèrent dans la diversité des eucaryotes (nombre de T-RFs) et la composition de l'assemblage picoplanctonique eucaryote (Fig 17). Certains groupes phylogénétiques sont détectés dans tous les types de traitements (Cryptophytes par exemple) tandis que d'autres groupes sont spécifiques de certains types d'enceintes (les chlorophytes sont spécifiques des enceintes recevant de forts apports en éléments nutritifs en association avec le groupe peu connu des LKM11) (A9).

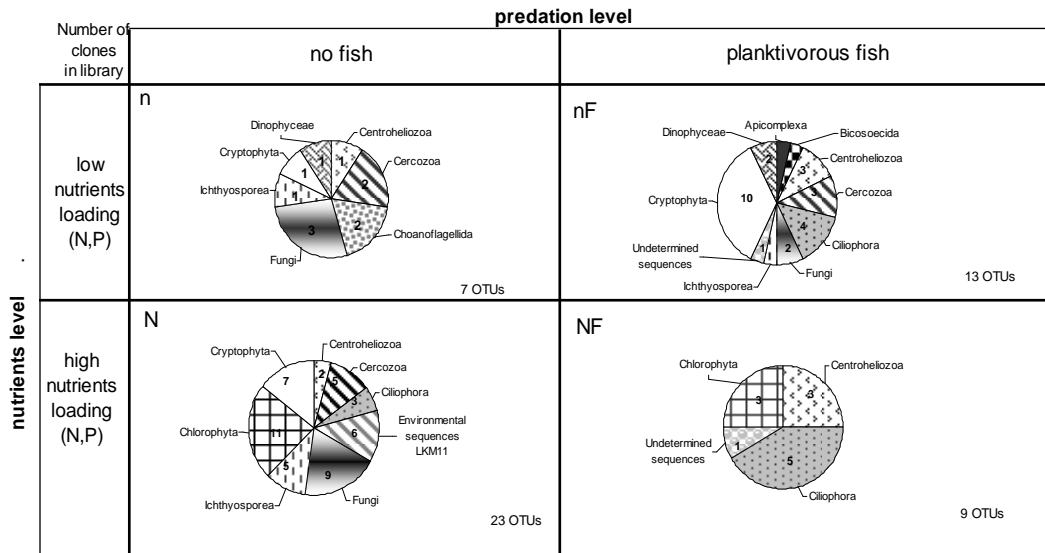


Fig 17. Variation du nombre d'OTUs et Proportion de chaque groupe phylogénétique (eucaryotes unicellulaires) dans la librairie de clones constituée pour chacun des types de traitements (contrôles, +Nutriments, +poissons planctivores, +Nutriments et poissons planctivores)

Si l'abondance des eucaryotes hétérotrophes (fraction de taille  $<5\mu\text{m}$ ) n'est pas significativement affectée par les manipulations, les changements de composition et diversité sont nets. Les deux types de facteurs de régulation affectent significativement la structure de cet assemblage eucaryote, qu'il s'agisse des autotrophes ou des hétérotrophes, et ceci via des interactions complexes et des cascades trophiques repérables à l'intérieur de la boucle microbienne. Ces modifications sont susceptibles d'impacter le fonctionnement de l'écosystème, notamment, parmi les hétérotrophes affectés par ces manipulations, une large part des séquences sont affiliées à des groupes parasites (Chytrides notamment) pouvant affecter la dynamique d'autres communautés planctoniques (A9).

➤ *Effets de l'augmentation des UV et de la température sur la structure et diversité des 'pico'eucaryotes*

**Objectifs :** Cette approche expérimentale a été réalisée sur le site MEDIMEER (MEDiterranean platform for Marine Ecosystems Experimental Research) de l'étang de Thau (Sète Université Montpellier), plateforme expérimentale équipée de mésocosmes et d'un système de régulation thermique et d'éclairage UV, permettant d'étudier les réponses du système face aux changements environnementaux. Ce travail a

		UV				
		In situ conditions	+ 20%			
Temperature	In situ conditions	Control				
		C 1 2 3 C+N 1 2 3	UV UV+N	In situ	Nutrients	
	+ 3°C	T				
		T+N 1 2 3 Temperature	TUV TUV+N Temperature + UV	In situ	Nutrients	

été mené dans le cadre du GDR Réseaux trophiques Aquatiques, en collaboration avec l'UMR 5119 (Ecolag- Univ. Montpellier II).

Le schéma expérimental est un plan factoriel croisant 3 facteurs : augmentation des UV (UV naturels ou + 20% par rapport aux intensités naturelles) – augmentation de la

Température (Température *in situ* ou + 3°C par rapport à la température *in situ*)- augmentation des teneurs en Nutriments (deux niveaux d'apports). La réponse de la communauté eucaryote (< 6µm) a été étudiée par des approches classiques de microscopie et des approches moléculaires : la constitution de bibliothèques de clones traitées par séquençage a été réalisée pour chacun des types de traitements en début d'expérience et en fin d'expérience (4 Jours) afin de révéler des changements dans la composition parmi les populations eucaryotes. Par ailleurs, une approche d'empreinte moléculaire : CE SSCP (collaboration avec J F Ghiglione UMR-CNRS 7621 -Banyuls) a permis de compléter l'analyse de la diversité eucaryote.

### Principaux résultats :

A la fois les analyses moléculaires et les dénombrements mettent en évidence des variations dans la richesse et dans la structure des eucaryotes unicellulaires en fonction des traitements. Les effets structurant sont enregistrés à différentes échelles : au niveau de la richesse (nombre d'OTUs), de la présence/absence ou proportions de certains grands groupes (Dinophyceae et Prasinophyceae par exemple) voire de certaines espèces (*Micromonas pusilla*). Globalement l'élévation de température a un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur l'abondance des eucaryotes pigmentés (Tableau 2).

Anova results (P)							
	Temp	UV	Nut	Temp x UV	Temp X Nut	Temp x UV	Temp x UV x Nut
<b>Pigmented eukaryotes (total)</b>	<b>0,004 (+)</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Prasinophyceae (all)	NS	0,066 (+)	0,081 (-)	0,088	NS	NS	NS
Prasino. Micromonas	NS	NS	NS	NS	<b>0,017</b>	NS	NS
Prasino. Ostreococcus	NS	NS	NS	<b>0,042</b>	NS	NS	NS
Prasino. Cymbomonas	0,059 (+)	0,082 (+)	NS	NS	NS	NS	NS
Trebouxiophyceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Prymnesiophyceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cryptophyceae	<b>&lt;0,001 (+)</b>	NS	<b>&lt;0,001 (-)</b>	NS	<b>0,002</b>	NS	NS
Bacillariophyceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Chrysophyceae	NS	NS	NS	NS	NS	0,098	0,023
Dinophyceae	NS	NS	<b>0,028 (+)</b>	NS	NS	NS	NS
<b>Heterotrophic flagellates cell.ml<sup>-1</sup></b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Ciliates cell.ml<sup>-1</sup></b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Bacteria</b>	<b>&lt;0,001 (+)</b>	<b>0,013 (-)</b>	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Virus</b>	<b>0,008(+)</b>	<b>&lt;0,001 (-)</b>	NS	<b>0,001</b>	NS	NS	NS
<b>Picocyanobacteria</b>	NS	NS	<b>&lt;0,001 (+)</b>	NS	NS	NS	<b>0,013</b>

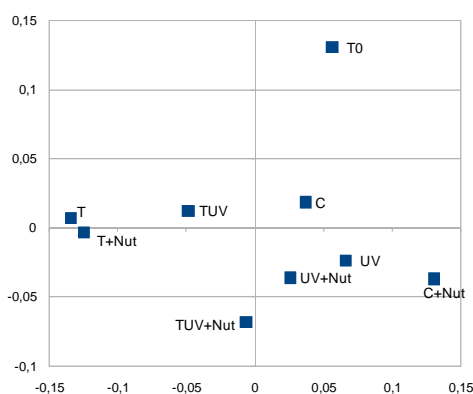
Tableau2: Résultats de l'ANOVA 3 facteurs mettant en évidence les effets structurant de l'augmentation de température, des radiations UV et des apports en nutriments : effets sur la structure des pico-eucaryotes et des communautés virales et bactériennes. Extrait de Domaizon et al en prep

Results of three ways ANOVA performed from T96h abundance values. P values obtained for temperature effect (Temp), UV effects (UV) Nutrients addition effects (Nut) and the interactions between the three factors are presented. + and - signs indicate the direction of the effect (positive or negative impact). Bold font corresponds to significant value with a  $p < 0,05$ , while normal font corresponds to a lower significance ( $p < 0,1$ ). NS is the code for non significant effect.

Parallèlement la structure des groupes pigmentés varie nettement en fonction des paramètres manipulés. Les groupes Dinophyceae et Prasinophyceae sont ceux qui subissent les plus nettes variations sous l'effet des manipulations testées. On note en particulier des effets nets sur l'espèce *Micromonas pusilla* qui est

remplacée par le genre *Cymbomonas*. Plus généralement le groupe des Prasinophyceae représenté initialement par *Micromonas pusilla* et *Ostreococcus tauri* est largement supplanté au cours de l'expérimentation par les Prymnesiophytes (*Chrysochromulina*) et par les Dinophyceae (*Gymnodinium*, *Peridinium*), respectivement sous l'effet de l'augmentation de la température et des nutriments.

Un nombre important de séquences affiliées à des taxa parasites sont recensées en fin d'expérimentation, en particulier les Hyphochytrides et les Dinophyceae du genre *Amoebophrya*. Le paramètre 'température' affecte significativement la part relative de ces deux groupes de parasites (dans les traitements subissant des élévations de température, *Amoebophrya* est représenté majoritairement).



Les effets structurant des facteurs testés apparaissent clairement au travers des analyses moléculaires, l'effet le plus net est associé au changement de température (Fig 18).

La complémentarité des observations microscopiques et analyses moléculaires ont pu être soulignées (dans les libraires de clones : sous estimations de certains groupes pigmentés mais détection de groupes hétérotrophes rares non recensés en microscopie).

Fig 18: Résultats de l'analyse UNIFRAC effectuée afin de comparer les 9 libraires de clones obtenues à T0 et T96h pour chacun des traitements soumis à la manipulation des facteurs Température, Nutriments, et UV.

Results from the UNIFRAC analysis realised from the 9 libraries of clones (number of clones for each OTUs)

Figure extraite de Domaizon et al en prep

**Valorisation scientifique sous forme de publications : Domaizon et al en prep. ; Lepère et al 2007 ;**

**Bouvy et al en prep.** + Communications à colloques

**Programme de recherche et financement :** GDR réseaux trophiques aquatiques : programme Virbac (coordonateur : T Bouvier Ecolag Univ Montpellier) + Programme EC2CO INSU (2006-2009)

**Collaborations :**

D Debroas C Lepère UMR CNRS 6023 LMGE Univ Blaise Pascal Clermont II

B Mostajir, T Bouvier UMR CNRS 5119 Ecolag Université Montpellier II

H Montagnié UMR LIENSs Université La Rochelle

M Bouvy, Y Bettarel IRD ECOLAG Université Montpellier II

JF Ghiglione UMR-CNRS 7621 Observatoire Océanologique de Banyuls

### 3. UNE NOUVELLE VISION DES ASSEMBLAGES 'PICO'EUCARYOTES LACUSTRES : LA QUESTION EMERGENTE DU PARASITISME DANS LES SYSTEMES PLANCTONIQUES

#### 3.1 La diversité taxonomique et fonctionnelle des protistes hétérotrophes planctoniques modifiée par la prise en compte des groupes potentiellement parasites - Contexte scientifique

Comme l'illustre les données moléculaires décrites ci avant, et comme peuvent l'illustrer également des données acquises dans d'autres milieux par des méthodes comparables (Lopez-Garcia et al, 2001 ; Massana et al, 2004 ; Not et al, 2008), l'éclairage apporté sur la composition des assemblages eucaryotes par le séquençage (18S essentiellement) soulève de nombreuses questions concernant l'abondance, la dynamique et le rôle précis de divers groupes phylogénétiques détectés, et pour certains jusque là ignorés par les approches morphologiques. La présence non négligeable (dans les libraires de clones) de groupes potentiellement parasites (A9, A8) ou de groupes pour lesquels très peu d'informations sont encore acquises (LKM11 par exemple) suggèrent très clairement que ces organismes ont été auparavant associés sans distinction dans le 'pool' des flagellés hétérotrophes, compte tenu de l'absence de caractéristiques morphologiques observables par les méthodes de microscopie classique. Les 'boîtes noires' que représentaient en particulier les 'flagellés hétérotrophes non déterminés', mais également le 'picophytoplancton eucaryote' sont donc aujourd'hui en partie révélée.

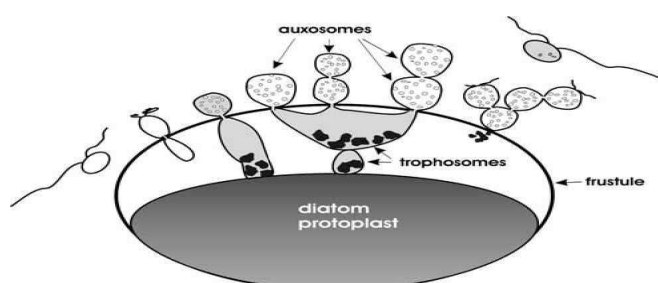
En particulier la part des taxa parasites dans les assemblages hétérotrophes est recherché aujourd'hui sur la base de ces connaissances réactualisées. La prise en compte de ces groupes parasites vient accroître la diversité fonctionnelle repérable chez les protistes hétérotrophes planctoniques. Les modèles d'interactions incluant les groupes parasites sont de fait plus complexes, avec en général des chaînes trophiques plus longues, une connectance et une efficacité de transfert de matière et d'énergie accrue. La complexité est liée notamment au fait que ces parasites ont des cycles de vie complexes et peuvent parfois infecter des organismes appartenant à différents niveaux trophiques (Arias Gonzales & Morand, 2006). Bien que de très nombreuses espèces phytoplanctoniques soient susceptibles d'être infectées par des parasites eucaryotes, l'étude de la diversité de ce groupe fonctionnel ainsi que ces impacts directs (mortalité des cellules hôtes) et indirects (effet en cascades sur les phénomènes de compétition, effet sur la redistribution et le recyclage de la matière organique et des nutriments via la lyse cellulaire) sont encore très mal évalués.

Dans les systèmes aquatiques principalement 4 lignées eucaryotes recèlent des organismes parasites. Les *Chytridiomycota* sont parmi les plus connus pour leur rôle parasitaire exercé contre les espèces phytoplanctoniques (Goldstein, 1960; Canter & Lund, 1969; Ibelings et al, 2004). Des taxa parasites ont



également été rapportés parmi les *Cercozoa* (phylum des *Rhizaria*), au sein desquels on recense quelques parasites de diatomées (Cavalier-Smith & Chao, 2003).

Parmi les Straménopiles, certains hyphochytrides sont connus comme étant des parasites de diatomées (i.e. *Pirsonia* – Fig 19).



**Fig.19.** Developmental stages of *Pirsonia* and *Pseudopirsonia*. : Motile flagellates attach and penetrate frustule with a pseudopod. The pseudopod phagocytises and digests portions of the diatom protoplast and thus differentiates into the trophosome. Nutrients are transported into the body of the former flagellate, now called auxosome. The auxosome grows and divides, forming offspring as long as trophosomes continue to phagocytise. Extrait de Kühn et al 2004

Toutefois la majorité des parasites appartiennent aux Alvéolés qui regroupent des parasites très différents parmi les Ciliés, Dinoflagellés, and Apicomplexe (Cavalier-Smith, 1993) dont l'activité parasitaire a été rapportée dans une large gamme de milieux (sol, aquatique marin, eaux douces).

Les Apicomplexes (ex-Sporozoaire) et Ciliés sont des parasites de populations terrestres et aquatiques (crustacés, poissons, mammifères) et sont étudiés essentiellement en raison des dommages sanitaires et économiques affectant la population humaine dans divers pays en développement (Hakimi & Deitsch, 2007). Mais en ce qui concerne les milieux aquatiques les Dinoflagellés constituent le principal réservoir de parasites aquatiques connus (Blastodinales, Syndiniales). Parmi eux les Syndiniales sont des dinoflagellés connus exclusivement comme parasite marin (*Hematodinium* spp., *Amoebophrya* spp.) développant une stratégie hôte-spécifique notamment contre d'autres dinoflagellés planctoniques (Groisillier et al, 2006; Chambouvet et al, 2008; Guillou et al, 2008). Le groupe des Perkinsozoa a été initialement repéré en milieu marin, et, notamment les deux genres *Perkinsus marinus* (Mackin et al, 1950) et *Parvilucifera infectans* (Norén et al, 1999) sont connus en tant que parasites de bivalves et parasites de dinoflagellés. Le rôle régulateur de ces deux espèces sur la dynamique saisonnière de leurs hôtes a été confirmé par différentes études, les taux de prévalence pouvant être extrêmement élevés (Ngo & Choi 2004 ; Gisselsson et al, 2002 ; Park et al, 2004). Il s'agit de parasites intracellulaires, proche phylogénétiquement des Dinoflagellés (Leander & Keeling 2003 ; Norén et al, 1999). Très peu de choses sont connues sur ce groupe en milieu d'eau douce, si ce n'est leur présence confirmée dans les libraires de clones constituées à partir d'échantillons environnementaux de divers lacs (Lefranc et al, 2005; Richards et al, 2005; Lefèvre et al, 2007; Lepère et al, 2006, 2008) ; et une publication mettant en évidence le rôle parasite de Cryptophycées d'un Perkinsozoa alors nommé *Cryptophagus subtilis* (Brugerolle 2002).

Aussi, dans la continuité des résultats ayant révélés la présence récurrente de Chytrides, Perkinsozoa, ou Cercozoa (parasites potentiels), nous avons eu ici pour objectif d'estimer la dynamique de ces groupes eucaryotes et leurs abondances relatives par rapport à d'autres groupes phylogénétiques. Par ailleurs le second objectif concerne la mise en relation entre la dynamique de ces groupes peu étudiés en milieu lacustre, et, la dynamique des autres organismes planctoniques ainsi que l'évolution des caractéristiques physico chimiques.

A partir des données moléculaires, plusieurs méthodes sont disponibles pour estimer leur importance quantitative et leur répartition dans les milieux aquatiques. L'une de ces méthodes consiste à élaborer des sondes oligonucléotidiques spécifiques et à les mettre en œuvre par marquage fluorescent (TSA-FISH) afin de réaliser des dénombrements à partir d'échantillons environnementaux divers.

Aussi, dans le cadre de la thèse de JF Mangot, par l'élaboration et la validation d'outils de ciblage (sondes oligonucléotidiques spécifiques), les premiers travaux ont été menés concernant la quantification et l'évaluation de la dynamique de divers groupes eucaryotes, dont des parasites putatifs et des groupes phylogénétiques quantifiés pour la première fois en milieu lacustre.

### 3.2 Une approche quantitative de la diversité des groupes eucaryotes - Les premiers résultats concernant la structure de l'assemblage eucaryote et la part des groupes parasites.

#### ➤ Détection, quantification et dynamique des groupes phylogénétiques eucaryotes lacustres

L'acquisition des premières données quantitatives concernant les divers groupes phylogénétiques détectés dans la fraction planctonique de petite taille (<5µm), a débuté par un travail d'élaboration de sondes spécifiques effectué dans la cadre de la thèse de JF Mangot. La spécificité de ces sondes a été testée *in silico* et sur cultures et des échantillons naturels, afin de les valider, et de les mettre ensuite en application dans le cadre de suivis environnementaux (Tableau 3, A12, A15, A17).

Sondes	Sequence (5'-3') of probes	Spécificité	References
EUK1209R	GCG CAT CAC AGA CCT G	Eukaryota	Giovannoni <i>et al.</i> (1988)
CERC_02	AAT ACG AGC ACC CCC AAC	Cercozoa	Mangot <i>et al.</i> (2009)
NCHLO01	GCT CCA CTC CTG GTG GTG	Non-Chlorophyceae	Simon <i>et al.</i> (1995)
CHLO02	CTT CGA GCC CCC AAC TTT	Chlorophyta	Simon <i>et al.</i> (2000)
CRYPT13	CGAAATATAACGGCCCAAC	Cryptophyceae	Lepère <i>et al.</i> (2008)
CHRYSO_01	TTTCGGACAAGGAAGACTCG	Chrysophyceae	Mangot <i>et al.</i> (2009)
PRYM02	GGAATACGAGTGCCCTGAC	Haptophyta	Simon <i>et al.</i> (2000)
LKM11_01	TAC TGT CAC TAC CTC GCC	LKM11	Mangot <i>et al.</i> (2009)
LKM11_02	TGG TCC TCA AAC CAA C	LKM11	Mangot <i>et al.</i> (2009)
MY1574	TCC TCG TTG AAG AGC	Fungi (Eumycota)	Baschien (2003)
PERKIN_01	GAG GAT GCC TCG GTC AA	Perkinsozoa	Mangot <i>et al.</i> (2009)
PERKIN_02	GCC AAA CAT TG T ACT GCG	Perkinsozoa	Mangot <i>et al.</i> (2009)

Sondes Oligonucléotidiques utilisées (Lepère et al 2008 ; Mangot et al 2009 ; Lepère et al soumis)

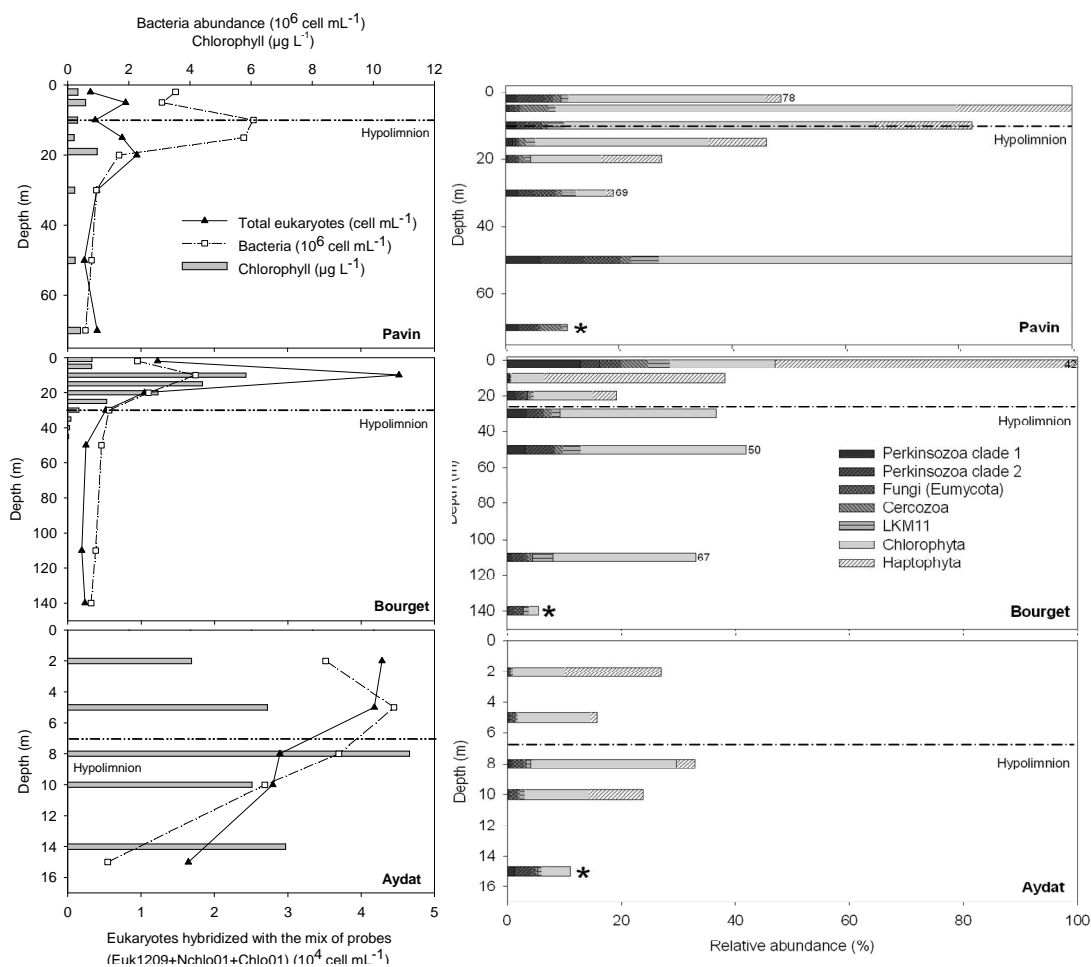
Tableau 3 : Liste et séquences oligonucléotidiques des sondes utilisées (extrait de Lepère et al 2008, Mangot et al 2009, Lepère et al soumis).

Deux types de stratégies d'échantillonnage ont été utilisés afin d'obtenir des informations sur la dynamique saisonnière de ces groupes et sur leur distribution verticale : un suivi annuel (échantillonnage mensuel) sur la strate 0-20m a été effectué sur le lac Mésotrophe du Bourget, et en parallèle un échantillonnage à partir de profils verticaux (à des profondeurs discrètes) a été mené sur 3 lacs de statut trophique différent en période de stratification thermique.

Les résultats obtenus concernant la distribution verticale de 6 groupes phylogénétiques (Chlorophyta, Haptophyta, Cercozoa, LKM11, Perkinsozoa, Fungi) sur 3 lacs (Pavin : oligotrophe, Bourget : mésotrophe ; Aydat : Eutrophe) ont permis de mettre en évidence un effet de la profondeur et du niveau trophique à la fois sur l'abondance et la structure des eucaryotes de petites tailles (<5µm). Les groupes ciblés ont été retrouvés dans tous les lacs, toutefois le milieu eutrophe se distingue de par l'abondance totale (plus élevée) et la structure (abondances relatives des différents groupes) des 'pico'eucaryotes.

Ces résultats permettent de souligner l'importance quantitative des cellules appartenant au groupe des Chlorophyta dans la fraction 'pico'planctonique lacustre (en moyenne des 27% des eucaryotes <5µm) ainsi que celle, inattendue dans de telles proportions, des Haptophyta dans la zone euphotique des lacs étudiés (32% des eucaryotes <5µm). En lien avec la présence de ces cellules pigmentées dans les zones les plus profondes des lacs, nous avons soulevé l'hypothèse d'un comportement mixotrophe pour ces taxa traditionnellement considérés comme photo-autotrophes. Les résultats des analyses par séquençage ont permis détecter essentiellement des séquences affiliées aux Chlamydomonadales (A12), groupe pour lequel Tittel et al (2009) ont récemment démontré l'activité hétérotrophe via l'exploitation de carbone organique dissout par osmotrophie (cas de *Chlamydomonas*). L'activité phagotrophe développée par certains haptophytes pigmentés tel que le genre *Chrysochromulina* retrouvé dans les systèmes lacustres pélagiques, a également été décrite par Legrand et al (2001). Alors que l'activité mixotrophe de certaines espèces phytoplanctoniques de grande taille (e.g *Dynobryon*) a été démontrée, ces résultats encouragent à examiner plus spécifiquement la potentialité de comportements mixotrophes dans la fraction planctonique de petite taille.

Par ailleurs, les résultats acquis pour les groupes hétérotrophes stricts, confirment l'importance relative de groupes potentiellement parasites et la présence récurrente de groupes rares (peu abondants) tels que les LKM11.



(A) Abundances of small eukaryotes targeted by the mix of the probes (Euk1209+NCL001+CHLO01) (cell mL<sup>-1</sup>) (▲), bacteria (10<sup>6</sup> cell mL<sup>-1</sup>) (□) and Chlorophyll concentration (µg L<sup>-1</sup>) (gray horizontal bar).  
 (B) Relative abundance of cells targeted by the oligonucleotide probes Chlorophyceae, Prymnesiophyceae, Fungi, LKM11, Perkinsozoa clade 1, Perkinsozoa clade 2, Cercozoa.  
 \* Depth at which haptophyceae were not counted

*Fig18 : Distribution verticale des paramètres biologiques et des principaux groupes eucaryotes ciblés par TSA-FISH sur 3 lacs d'état trophique différent. Figure extraite de Lepère et al soumis (A17)*

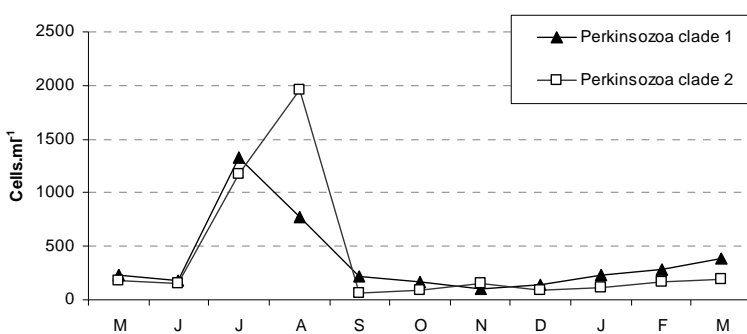
Le suivi annuel (échantillonnage mensuel) au cours duquel les dynamiques des groupes potentiellement parasites Chytrides, Perkinsozoa, et Cercozoa ont été suivies, a eu pour objectif d'établir une première mise en relation entre la dynamique de ces groupes et la dynamique des autres organismes planctoniques ainsi que l'évolution des caractéristiques physico chimiques.

Cette approche quantitative *in situ* a concerné 6 groupes phylogénétiques : Chrysophyceae, Cryptophyceae, Cercozoa, LKM11, Perkinsozoa (2 clades) and Fungi.

Probes	specificity of probe	Mean abundance cells.ml-1 (min - max)
EUK1209R	Eukaryota	4007 (1692 – 10782)
CERC_02	Cercozoa	221 (50 – 753)
CHLO02	Chlorophyceae	605 (236 – 1828)
CRYPT_13	Cryptophyceae	339 (131 – 753)
CHRYSO_01	Chrysophyceae	903 (277 – 3683)
LKM11 (two probes)	LKM11	122 (73 – 297)
MY1574	Fungi (Eumycota)	288 (119 – 570)
PERKIN_01	Perkinsozoa clade 1	367 (107 -1322)
PERKIN_02	Perkinsozoa clade 2	393 (64 – 1953)

*Tableau 4 : Abondances moyennes obtenues pour chaque groupe de eucaryotes unicellulaires ciblés par des sondes spécifiques au cours d'un suivi annuel (Lac du Bourget 0-20m) - Tableau Extrait de Mangot et al. 2009*

Ces résultats quantitatifs obtenus pour 11 dates différentes (dans la strate 0-20m du Lac du Bourget), confirment les hypothèses émises quand à la forte représentation de groupes parasites potentiels par les méthodes non quantitatives (clonage séquençage) ou semi quantitative (T-RFLP), ou par l'estimation d'abondance ponctuelle (réalisée à une date précise). Le groupe des Perkinsozoa peut représenter, dans la zone éclairée du lac du Bourget, jusqu'à 31.6% des eucaryotes ciblés par la sonde généralistes (EUK 1509r) au cours de la période estivale (A15). La dynamique des cellules du clade 1 des Perkinsozoa est significativement corrélée avec celle de certains dinoflagellés (*Peridinium* et *Ceratium*) tandis que les Perkinsozoa du clade 2 évoluent de manière corrélée avec le genre *Dinobryon* (Chrysophyceae). L'abondance maximale des champignons est maximale en période hivernale, la dynamique de ce groupe



est significativement corrélée à celle de diatomées telles que *Melosira varians*. Par ailleurs cette étude a permis de mettre en évidence la présence récurrente à chaque date d'échantillonnage de cellules appartenant au groupe des cercozoa (6.2%) et LKM11 (4.5%) (A15).

Fig 20. Evolution temporelle de l'abondance des Perkinsozoa dans la strate 0-20m (Lac du Bourget). Extrait de Mangot et al 2009 (A15)

### 3. 3. Point bibliographique concernant un groupe nouvellement suivi dans les milieux lacustres : Perkinsozoa

Parmi les groupes parasites ou potentiellement parasites, le groupe des Perkinsozoa bien connu en milieu marin a retenu tout particulièrement notre attention. Dans les systèmes marins ce groupe est constitué exclusivement de parasites intracellulaires, notamment parasites de mollusques et d'espèces phytoplanctoniques, mais en milieu d'eau douce leur diversité et leur rôle est encore inconnu. Un point bibliographique relatif à ce groupe eucaryote en particulier est donc proposé ci après :

#### Position phylogénétique des Perkinsozoa au sein des Alvéolés

Les Perkinsozoa étudiés essentiellement en milieux marins (Mackin et al, 1950; Norén et al, 1999; Casas et al, 2008; Park et al, 2002, 2004, 2006), occupent une position systématique controversée, étant

alternativement liés aux Apicomplèxes ou aux dinoflagellés (Coss et al, 2001; Brugerolle 2002). Sur la base de caractéristiques ultrastructurales et d'études phylogénétiques (18S rRNA) ciblant *Parvilucifera infectans*, Norén et al (1999) ont établi le phylum des Perkinsozoa, appartenant aux Alvéolés. Toutefois une plus grande proximité phylogénétique est suggérée entre les *Perkinsus* et les dinoflagellés syndiniales (Bushek et al, 2002). Quoiqu'il en soit le phylum des Perkinsozoa est considéré comme regroupant uniquement des parasites (Moreira & Lopez-Garcia, 2002), et il est organisé en 2 clades au sein desquels parmi les genres les plus connus on recense les *Perkinsus* spp. (parasites de mollusques) et *Parvilucifera* spp. (parasites de dinoflagellés).

### **Les Perkinsozoa dans les systèmes marins :**

Les problèmes de mortalité liés aux infections dont ils sont responsables ayant d'importants impacts économiques pour les espèces commercialisées telles que les huîtres, d'assez nombreuses études ont été menées sur le genre *Perkinsus*. Si la plupart des *Perkinsus* spp semblent être spécifiques d'un hôte bivalve (clams ou huître), quelques uns semblent toutefois capables d'infecter plusieurs types d'hôtes, à titre d'exemple *Perkinsus olseni* parasite à la fois les clams et les ormeaux (Elandaloussi et al, 2009 Park et al, 2006 ; Lester et al, 1990). Les taux de prévalence rapportés pour *P. marinus*, *P. atlanticus* and *P. olseni* sont très variables et peuvent parfois atteindre des valeurs très élevées (jusqu'à 100%) (Ngo & Choi, 2004; Burreson et al, 1994). Des variations saisonnières de la prévalence ont été rapportées par divers auteurs (Gullian-Klanian et al, 2008; Ngo & Choi, 2004), ces changements étant visiblement liés à certains paramètres environnementaux tels que la température, la salinité, les teneurs en phosphore et en silice.

Le groupe des *Perkinsozoa* est également constitué de parasites de protistes. *Parvilucifera infectans* est connu pour sa capacité à infecter 26 espèces algales, 17 desquelles appartiennent aux dinoflagellés (Park et al, 2004). La distribution géographique de ces parasites est très large, et ils sont généralement répertoriés comme étant des agents infectieux des dinoflagellés photosynthétiques et hétérotrophes en milieux marins (Park et al, 2004). Bien que les taux de mortalité dont ils sont responsables aient rarement été estimés, plusieurs auteurs suggèrent que *Parvilucifera infectans* aurait un effet régulateur significatif, et serait impliqué dans la terminaison des blooms et le contrôle des populations de dinoflagellés (Gisselson et al, 2002 ; Park et al, 2004). D'autres espèces phylogénétiquement proches de *P. infectans* ont été récemment isolées et étudiées. *Parvilucifera sinerae* sp. nov., a par exemple été isolé en mer méditerranée à partir d'un bloom de dinoflagellés *Alexandrium minutum* (Figueroa et al, 2008), et *Parvilucifera prorocentri* sp. nov, a été détecté comme parasite du dinoflagellé benthique *Prorocentrum fukuyoi* (Leander & Hoppenrath, 2007).

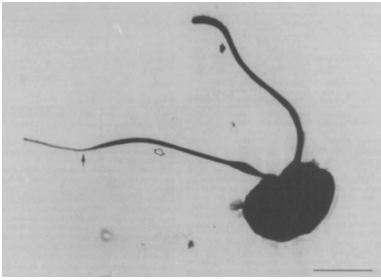


Fig 20a Negative staining of the zoospore of *Perkinsus* sp. isolated from *Macoma balthica*. Scale bar = 2  $\mu$ m (from Coss *et al*, 2001).  
Extrait de Mangot et al en révision (A16)

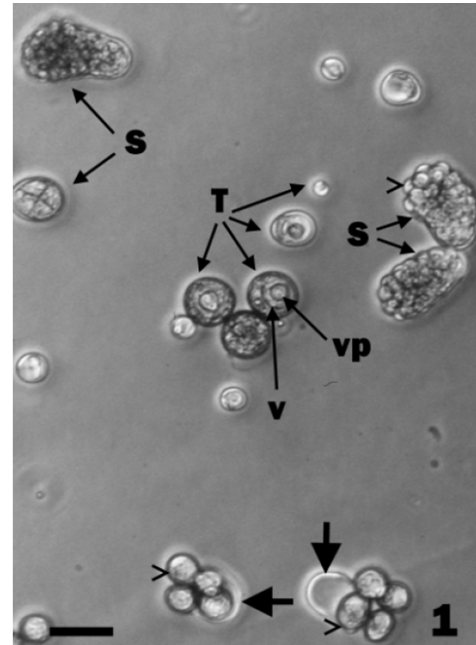


Fig 20b Light micrograph of the different live stages of cultured *Perkinsus mediterraneus* cells in JL-ODRP-2F medium. Trophozoites (T) showing a granular cytoplasm with a large vacuole (v) and a prominent vacuoplast (vp). *Perkinsus mediterraneus* divides by schizogony, and schizonts (S) vary in size. Scale bar: 20  $\mu$ m (from Casas *et al*, 2008). Extrait de Mangot et al en révision (A16)

### Cycle de vie et facteurs de régulation des Perkinsozoa en système aquatique

Des caractéristiques communes sont retrouvées pour les cycles de vie décrits chez les trois genres *Perkinsus* spp., *Parvilucifera* spp. et *Cryptophagus* sp. (unique taxa décrit en milieu d'eau douce). Comme c'est le cas pour les champignons, les Perkinsozoa présente un stade libre infectieux (zoospore flagellée). Les étapes d'infection par les trophozoïtes ont été bien décrites essentiellement chez *Perkinsus* spp. (parasite de mollusques) (Fernández-Robledo *et al*, 2008 ; Mackin *et al*, 1951). A la suite de la phase d'infection, pour les trois genres, ont été décrits un stade trophonte intracellulaire (Coss *et al*, 2001; Norén *et al*, 1999 ; Brugerolle 2002). Les quelques études disponibles permettent de proposer un scénario global pour le cycle de vie des Perkinsozoa : après l'adhésion du sporozoïte à la surface de la cellule hôte, la zoospore pénètre dans le cytoplasme de l'hôte. Le trophonte croît dans le cytoplasme de l'hôte et poursuit ses divisions soit dans un sporange (*Perkinsus* spp. et *Parvilucifera* spp.) soit libre dans le cytoplasme (*Cryptophagus* spp.). Après 4-5 divisions mitotiques la différenciation trophozoïte/sporozoïte se produit, et bourgeonne à la surface de la cellule hôte. Les sporozoïtes acquièrent alors des flagelles, et d'autres structures apicales, et sont relâchés à l'extérieur de l'hôte. Parfois un état enkysté peut apparaître au cours

de la phase trophozoïte. Ce scénario global est certainement transposable à la plupart des Perkinsozoa, toutefois, la description précise des cycles de vie n'a été faite que pour quelques espèces.

### **Détection de Perkinsozoa dans les écosystèmes lacustres**

Les travaux visant à décrypter la diversité eucaryote dans la plus petite fraction de taille ont permis de mettre en évidence la présence de ce groupe en milieu lacustre, et ceci dans des proportions non négligeables (voir § 3.2). Les résultats obtenus par Lefranc et al 2006 rapportent que les Perkinsozoa peuvent représenter 60% de la librairie de clones (18S rRNA gene) obtenue à partir d'échantillons environnementaux issus du lac d'Aydat (été- zone euphotique). Le groupe des Perkinsozoa a été détecté par Richards et al. (2005) dans le Lac George oligotrophe (zone euphotique), les travaux de Lefèvre et al (2007, 2008) ont confirmé la présence de ce groupe dans le lac Pavin. Les travaux menés dans le cadre de la thèse de C Lepère, nous ont permis de rapporter la présence dans la zone épilimnique du Lac du Bourget (A12) à deux périodes d'échantillonnage pour lesquelles des librairies de clones (18S) ont été constituées. Suite à l'approche quantitative menée dans le cadre du travail de thèse de JF Mangot, les dynamiques saisonnières obtenues dans le lac du Bourget, ainsi que les distributions verticales de ce groupe sur 3 lacs (A17 soumis) nous permettent de réaffirmer l'intérêt de progresser dans la connaissance de ce groupe eucaryote en milieu lacustre, et d'identifier les liens hôtes-parasites existants dans ces systèmes planctoniques.

**Valorisation scientifique sous forme de publications : Mangot et al 2009 , Mangot et al en révision ; Lepère et al soumis ; + Communications à colloques**

**Programme de recherche et financement : Programme Cible région (2007 – 2010)**

**Collaborations :**

L Guillou Station Biologique de Roscoff UMR 7144

D Moreira UMR CNRS 8079 Univ. Paris Sud Orsay

D Debros UMR CNRS 6023 LMGE Univ Blaise Pascal Clermont II



#### 4. REMARQUES SYNTHETIQUES RELATIVES AUX RESULTATS ACQUIS ET AUX PROLONGEMENTS DE CES TRAVAUX

Dans le prolongement des résultats acquis au cours des dernières années, divers points seront discutés dans la partie 'Perspectives', il s'agit de questions de recherche qui constitueront les axes principaux de recherche que je souhaite développer à court et moyen termes. Toutefois d'autres points méritant d'être explorés plus avant, ne seront pas discutés précisément, et sont évoqués dans la discussion qui suit.

##### Des acquis, ...

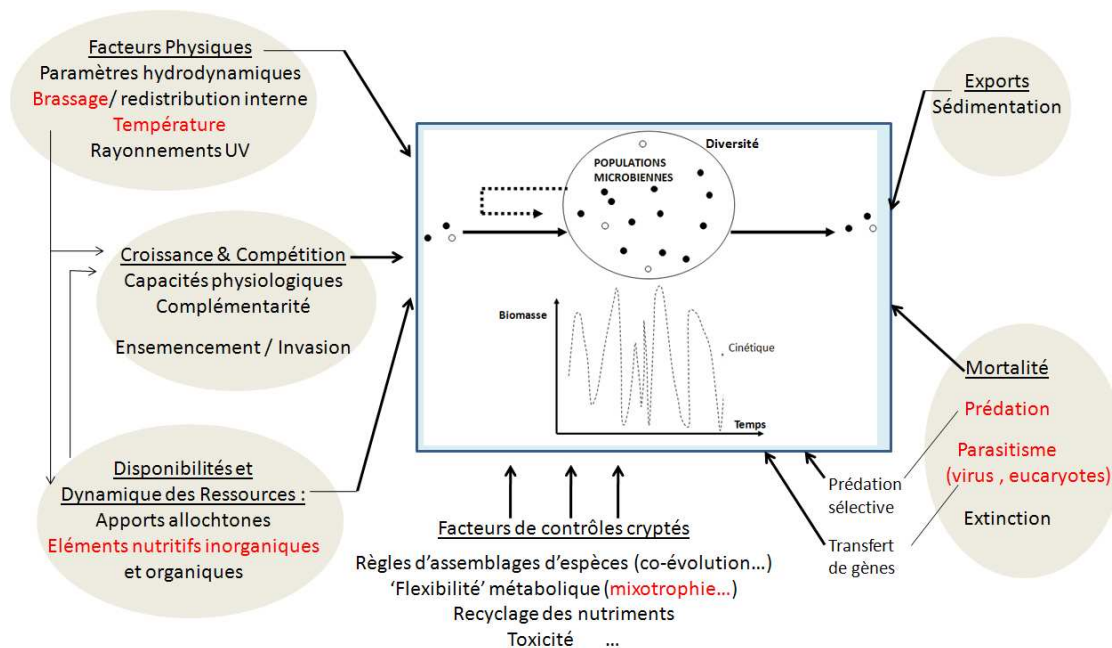


Fig21. Illustration des principaux facteurs affectant la dynamique et diversité des communautés microbiennes (en rouge apparaissent les facteurs dont les impacts ont été pris en compte dans les travaux menés depuis 2000).

Comme cela est illustré sur le schéma ci-dessus, la dynamique des communautés planctoniques (abondance et structure) s'organise sous l'influence de divers facteurs de régulation qui sont eux même parfois interconnectés. Parmi ces facteurs, certains ont été au centre des études que j'ai menées au cours des 10 dernières années. Il s'agit notamment des aspects de régulation par les ressources et la prédation, par l'impact de la lyse virale, avec en parallèle un souci de décryptage de la diversité des communautés microbiennes. Des schémas d'organisation des réseaux trophiques microbiens (RTM) ont pu être proposés, en tenant compte des évolutions saisonnières repérables *in situ*. Si, les comparaisons inter-lacs et la répétition d'expérimentations ont conduit à repérer **certaines spécificités**, notamment en ce qui concerne l'activité mixotrophe (taxa pigmentés mixotrophes) plus marquée dans le lac oligotrophe d'Annecy ; il

n'en reste pas moi que ces comparaisons permettent de mettre en évidence **une similitude dans l'organisation des RTM planctoniques et le rôle de groupes clés** (bactérovores <5µm ; ciliés oligotriches notamment) impliqués dans les transferts trophiques vers les niveaux supérieurs (métazooplancton, poissons zooplanctonophages). Ces connaissances permettent de mieux comprendre par quel biais les communautés microbiennes hétérotrophes représentent, à certaines périodes dans les lacs péri-alpins, un soutien non négligeable à la production secondaire. Ce type de cas a été observé notamment dans le lac oligotrophe d'Annecy où, la croissance des jeunes stades de corégone (stades larvaires) s'est révélée être soutenue significativement par du carbone d'origine terrestre transitant par la boucle microbienne et contribuant à la production secondaire au niveau des copépodes (copépodes représentant une contribution alimentaire importante pour les jeunes stades de corégones) (Perga et al, 2009).

D'une manière globale, l'analyse des facteurs de régulation conduite au cours de ces travaux permet de souligner le rôle structurant de la prédation sur la richesse et la structure (diversité) des communautés picoplanctoniques (les impacts fonctionnels de ces changements de diversité étant encore mal connus). Toutefois, alors que pour les réseaux herbivores (phytoplancton/métazooplancton/poissons planctonophages), les effets de prédation se traduisent souvent par des phénomènes de cascades trophiques relativement facilement détectés ; il s'est avéré plus difficile de mettre en évidence des effets en cascades au sein des réseaux microbiens. Ceci est lié (i) à la présence dominante d'organismes omnivores (protistes phagotrophes consommant d'autres protistes hétérotrophes par exemple), et, (ii) au fait que les contours de certains groupes fonctionnels (flagellés hétérotrophes par exemple) doivent être 'redéfinis' en tenant compte de la diversité taxonomique et fonctionnelle révélée par les outils moléculaires.

Les travaux décrits (§ 1, 2, 3) s'inscrivent tous dans une démarche globale finalisée puisque la question générale demeure celle de la compréhension du fonctionnement et des réponses des réseaux trophiques aux facteurs de forçages, il n'en reste pas moins que les études menées ont été, en général, ciblées, et apportent des éclairages à des échelles (de temps et d'espaces) parfois limitées.

### **... et de nombreuses questions inexplorées concernant :**

#### **-Paramètres physiques et hétérogénéité spatiale**

Ces travaux de recherche se sont essentiellement focalisés sur les strates supérieures des lacs (0-50m) ce qui, bien que reflétant l'état du système pélagique, ne saurait, seul, permettre d'interpréter le fonctionnement global du système (notamment dans le cas des lacs profonds). De nombreux aspects n'ont pas été pris en compte, notamment le rôle des facteurs hydrodynamiques qui façonnent en partie la

distribution spatiale des communautés microbiennes, en particulier dans les grands lacs soumis à des phénomènes d'ondes internes (Bournet et al, 1996).

La prise en compte d'un seul point central d'échantillonnage peut par ailleurs toujours être soumise à critique, même si certains travaux par des approches spatiales comparatives ont permis d'étayer la représentativité d'un point d'échantillonnage pélagique (en particulier pour les communautés microbiennes (Dorigo et al, 2006)).

Le rôle structurant des paramètres physiques (température, stabilité de la colonne d'eau et brassage expliquant la re-distribution des éléments chimiques ...) interviennent directement dans la dynamique des communautés planctoniques, notamment via le couplage entre zone pélagique et zone benthique. Les zones benthiques sont des zones de ré-ensemencement (réservoirs d'espèces, enkystement des protistes, phase de latence des cyanobactéries... (Pfundl & Boegnik 2006 ; Latour et al 2004), de transformation (des matières organiques notamment), de stockage et recyclage. A l'heure actuelle, dans le cas des grands lacs péri-alpins, peu de travaux se sont intéressés à ces couplages benthos-pelagos. Dans la cadre des projets 2010 -2014 de l'équipe BioFEEL du CARRTEL, des efforts sont fait dans ce sens.

### - Interactions biotiques

Les travaux présentés dans la partie 'Bilan' de ce dossier, ont apporté des informations concernant la diversité structurelle et fonctionnelle des réseaux trophiques lacustres avec un zoom particulier sur les effets top-down et bottom-up s'opérant au niveau microbien. Il n'en reste pas moins que certains facteurs de contrôles biotiques n'ont pu être pris en compte (relations de mutualisme, de compétition ...). Parmi ces interactions encore mal appréhendées dans bien des cas, **la diversité fonctionnelle potentielle liée à la présence de 'micropatches' représentés par les phycosphères (Bell et al, 1974) et détritisphères (Biddanda & Pomeroy, 1988) est certainement un sujet sur lequel des progrès sont attendus à court terme.** Ces 'micropatches' fonctionnant comme des micro-niches sont susceptibles de représenter des 'hot spots' pour les processus microbiens pélagiques. Les comparaisons entre communautés microbiennes libres ou fixées (sur supports algaux ou autres particules organiques) sont assez contradictoires, et relativement rares en milieu lacustre. Les fractions bactériennes libres et attachées ont été rapportées comme étant différentes d'un point de vue taxinomique et fonctionnel (Hasegawa et al, 2007 ; Smith et al, 1992). A l'inverse, d'autres auteurs mettent en évidence une composition identique dans ces deux types de fractions bactériennes (Selje & Simon 2003). Ces résultats contradictoires sont certainement liés au fait que (i) les communautés libres et attachées interagissent, s'auto-ensemencent (Riemann & Winding 2001 ; Gighiglione et al, 2009), (ii) les facteurs environnementaux et la qualité de matières organiques et

d'exsudats disponibles sont fortement structurants (Gossart, 1999 ; Sapp et al, 2007). Les données récentes rapportées par Ghiglione et al (2009) tendent à montrer que même si la colonisation des particules organiques semblent s'opérer de façon ubiquiste par les groupes bactériens, la plupart du carbone organique re-minéralisé est pris en charge par un faible nombre de taxa réellement actifs à l'échelle de ces micro-environnements. Au niveau de la phycosphère, des effets régulateurs mutuels (des bactéries sur les algues, et inversement) ont été suggérés par différents auteurs. Ces règles d'assemblages d'espèces entre bactéries et algues sont complexes mettant en jeu des relations de mutualisme (Bruckner et al, 2008), de commensalisme, de parasitisme (Fukami et al, 1997), de toxicité (production de molécules à effets antibactériens par certaines espèces phytoplanctoniques (Naviner et al, 1999).

Les interactions biotiques évoquées ici sont données à titre d'exemple de facteurs de contrôles cryptés affectant la dynamique et diversité bactérienne globale. Des questions comparables concernant la part des communautés libres et attachées (ou associées) dans le fonctionnement global et le recyclage des matières et éléments peut s'adresser également aux protistes hétérotrophes puisque nombre d'entre eux sont épiphytes obligatoires ou accessoires (occasionnellement associés à des agrégats). Des auteurs se sont déjà intéressés à la part des flagellés fixés ou libres (Carrias et al 1998). La question des **associations d'espèces** fait également écho aux interactions de type parasitisme planctonique dont certaines sont connues de longue date (relation chytrides-diatomées par exemple (Canter & Lund 1951 ; Canter 1983 ; Bertrand et al, 2004). Les travaux de recherche qui seront poursuivis concernant les 'parasites eucaryotes' seront discutés dans la partie perspectives de ce manuscrit. Des interrogations diverses peuvent être développées concernant la place des parasites eucaryotes dans les réseaux planctoniques : diversité des taxa parasites, spécificité d'hôtes, co-evolution hôtes-parasites, poids dans la régulation de l'espèce hôte... L'existence de parasites eucaryotes capables d'infecter des espèces de petites tailles n'a pas été vérifiée à l'heure actuelle ; les parasites eucaryotes sont plutôt connus comme ayant des hôtes appartenant aux fractions de tailles planctoniques supérieures (micro-phytoplancton, zooplancton). L'hypothèse d'une **complémentarité** entre parasites eucaryotes régulant les plus grandes espèces phytoplanctoniques, et parasites viraux infectant plus particulièrement le bactérioplancton et les espèces picoplanctoniques, peut être posée.

Certaines combinaisons d'espèces sont en effet complémentaires dans les ressources qu'elles utilisent et peuvent augmenter les taux moyens de productivité et l'efficacité de 'captation, d'utilisation' des nutriments. Parallèlement les conditions environnementales peuvent influencer 'l'importance ou le niveau' de cette complémentarité en structurant les communautés. Aujourd'hui l'identification des espèces complémentaires et le mode de leur complémentarité (la manière dont elles sont complémentaires) à l'intérieur d'assemblage complexes est probablement seulement à son début.

### -Mixotrophie

Les questions relatives à la mixotrophie s'inscrivent également dans ces réflexions concernant la 'complémentarité fonctionnelle' ou plus justement l'efficience fonctionnelle (complémentarité des espèces en tant que facteur de productivité). Une meilleure connaissance du rôle, et, de l'importance de la mixotrophie me semble pouvoir contribuer largement à la compréhension des liens entre 'diversité des communautés' et 'fonctionnement des écosystèmes'. Différentes stratégies et modèles de mixotrophie basés sur l'importance relative de phototrophie et hétérotrophie et les facteurs influençant l'activité mixotrophe ont été décrits (Jones, 2000 ; Stickney et al, 2000 ; Stoecker, 1998), toutefois la part relative de ce mode trophique dans le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens est incomplètement appréhendé. De nombreux résultats suggèrent que ce mode trophique est largement répandu et très certainement sous estimé dans le fonctionnement des communautés microbiennes. La prise en compte de cette activité n'implique pas seulement une réflexion en lien avec des phénomènes de compétitions entre espèces pigmentées (pures autotrophes vs mixotrophes), mais l'attention peut également être portée sur les possibles impacts sur le recyclage des éléments nutritifs ; Rothraupt (1997) démontre par exemple que des Chrysophytes bactérivores purement hétérotrophes (bactériophage pur : *Spumella* sp), ou mixotrophes (*Ochromonas* sp), influencent différemment le 'turn-over' des éléments nutritifs (dont le P) impactant ainsi indirectement les éléments disponibles pour la croissance algale, et la production primaire. Comme cela a été précédemment évoqué (§ 1.2.3), les mixotrophes doivent très certainement être intégrés dans les modèles de fonctionnement des réseaux trophiques.

### -Nécessité d'une synthèse-intégrative des données acquises concernant les résultats relatifs au fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques

L'extrapolation des principaux résultats (travaux de recherche 2000-2009) au fonctionnement plus global du système lac est un exercice délicat. Une étape intermédiaire permettant une synthèse organisatrice des données acquises pourrait être la mise à profit des données relatives aux RTM dans le cadre d'une modélisation, par exemple via un modèle de type analyse inverse.

Compte tenu des interactions complexes évoquées ci avant, qui, pour beaucoup, sont mal quantifiées, il n'est pas question à l'heure actuelle de développer des approches de modélisation prédictives du fonctionnement des réseaux planctoniques (microbiens en particulier), il peut s'agir par contre d'organiser les données dans le but de réaliser un modèle à l'équilibre du transfert du carbone entre les groupes fonctionnels planctoniques mais également de tester l'importance de l'introduction dans ce modèle des groupes parasites eucaryotes qui sont jusque là très rarement pris en compte dans le fonctionnement du

système.

La construction de ce genre de modèles pourrait s'appuyer largement sur les résultats de suivis écosystémiques et les expérimentations réalisées au cours de ces dernières années sur les grands lacs péri-alpins (en particulier le lac du Bourget). Une approche de modélisation permettrait de synthétiser les informations acquises, le but étant de lier dans une même description les interactions biologiques et physiques et d'intégrer les variations temporelles observées à l'échelle de l'année.

Dans l'objectif de réaliser une synthèse organisatrice des données à l'aide d'outils adaptés, et d'autre part de tester l'effet de l'introduction dans le modèle de groupes parasites très rarement pris compte malgré le rôle fonctionnel important qu'est susceptible d'exercer le parasitisme planctonique, l'approche mathématique qui pourrait être utilisée est une modification de l'analyse inverse telle que développée par Vézina & Platt (1988), puis modifiée par Leguerrier et al, 2003, 2004. La méthode de l'analyse inverse (Vézina 1989) est particulièrement adaptée à la construction de réseaux trophiques, elle représente un moyen efficace d'estimation des flux manquants, elle a été appliquée à différents écosystèmes (Vézina and Pace 1994 ; Niquil et al, 1998, 2006 ; Breed et al, 2004 ; Grami et al 2008) et récemment, a été adaptée afin de rendre compte de changements temporels dans le fonctionnement des systèmes modélisés. Bien que ce type de projet ne soit pas présenté dans la partie 'Perspectives' de ce document, il s'agit d'une démarche envisagée.



## **Projets et Perspectives de Recherche**



Certains des axes de recherche qui seront développés à court et moyen termes, s'inscrivent dans le prolongement des données acquises au cours des 5 dernières années sur le système pélagique lacustre : suite aux travaux menés sur l'analyse de la diversité des eucaryotes unicellulaires par des approches de clonage séquençage, des questions nouvelles ont émergées, elles concernent d'une part sur un plan d'écologie fonctionnelle, **la place des parasites eucaryotes dans les réseaux trophiques planctoniques** ; et, d'autres part, sur un plan d'écologie plus théorique, **le concept d'espèces rares parmi les eucaryotes unicellulaires** faisant échos aux nombreuses questions relatives aux patrons de diversité et à la distribution biogéographique des micro-organismes. D'autres axes, concernant également le fonctionnement des réseaux trophiques, s'intéresseront à d'autres compartiments que la zone pélagique, et notamment au compartiment benthique. En particulier l'analyse de la diversité eucaryote sera menée sur des échantillons de sédiments des grands lacs périalpins (sédiments récents et anciens). Plusieurs objectifs seront associés à ce travail, mais l'objectif principal, relativement innovant en écologie aquatique, concernera l'analyse de **l'ADN fossile en vue de l'obtention de profils génétiques reflétant l'archivage de 'restes moléculaires' des communautés microbiennes passées** (en lien avec un programme ANR coordonné par l'UMR CARTELE –M Perga). Ce travail a été initié en 2009, et devrait avoir des prolongements à long terme.

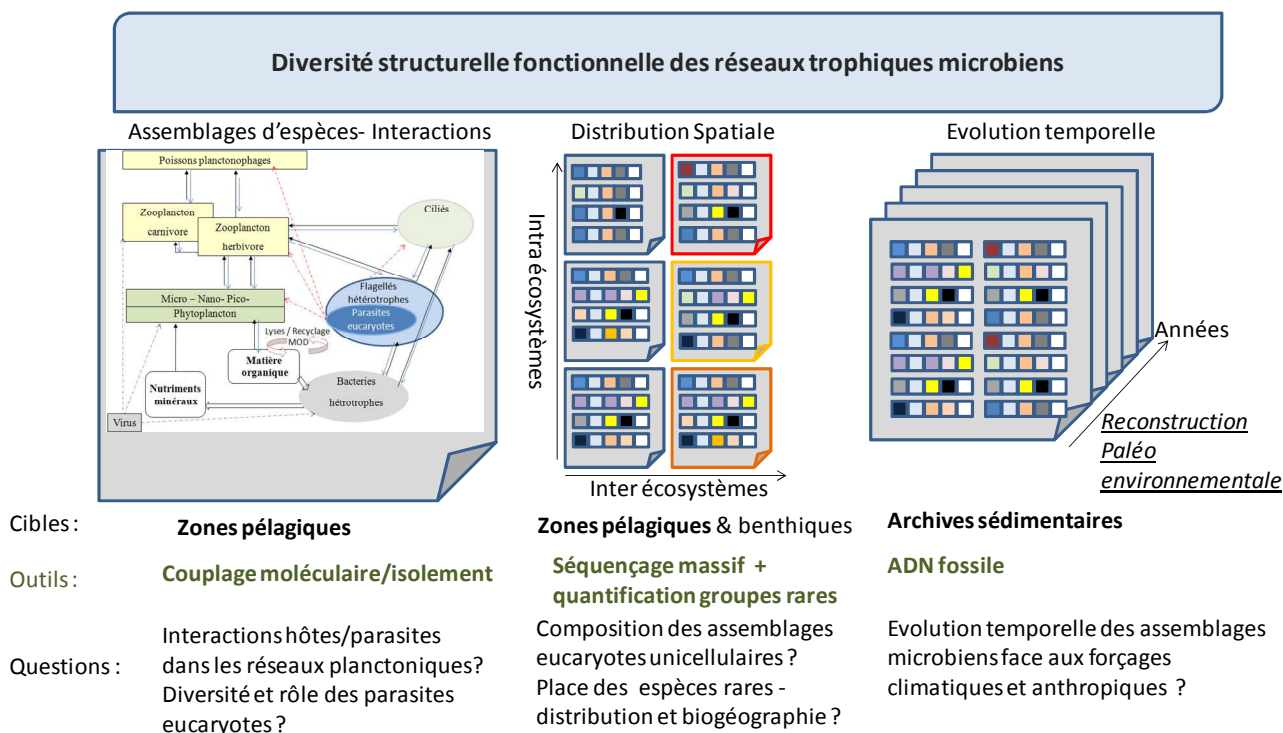


Fig 22. Illustration des 3 principaux volets de recherche s'inscrivant dans les perspectives à partir de 2010

## 1. DIVERSITE ET ROLE DES PARASITES EUCARYOTES EN MILIEU LACUSTRE : VERS L'IDENTIFICATION D'ASSOCIATION HOTES PARASITES

### Objectifs et approches mises en œuvre :

Les questions posées s'inscrivent dans le prolongement des connaissances récemment acquises sur l'organisation des réseaux trophiques lacustres (notamment les grands lacs péri alpins). L'objectif principal est l'étude de la dynamique et de la diversité de micro-organismes eucaryotes potentiellement parasites, groupes récemment 'remis en lumière' par des analyses moléculaires, et pour lesquels on possède aujourd'hui les premières données quantitatives, mais très peu d'informations quant à leur importance fonctionnelle dans les systèmes lacustres.

De très nombreuses espèces phytoplanctoniques étant susceptibles d'être infectées par des parasites eucaryotes, l'étude de la diversité de ce groupe fonctionnel ainsi que ces impacts directs (mortalité des cellules hôtes) et indirects (effet en cascades sur les phénomènes de compétition, effet sur la redistribution de la matière organique et des nutriments) doivent être considérés avec plus d'attention.

Des résultats récents ayant permis de révéler la présence récurrente de Chytrides, Perkinsozoa, Cercozoa, qui, dans d'autres milieux aquatiques, sont des groupes parasites impliqués dans des mortalités phytoplanctoniques massives, ou dans des effets sélectifs sur la composition taxonomique algales ; dans le cadre de ce projet, il est proposé d'approfondir la thématique du parasitisme eucaryote en milieu lacustre. Ce travail s'appuiera sur l'utilisation d'outils moléculaires couplés aux méthodes d'investigation dites plus classiques (microscopie, isolement d'espèces parasitées) afin de progresser dans la connaissance de la diversité, de la dynamique et du rôle de ces micro-organismes eucaryotes parasites.

Les sondes oligonucleotidiques spécifiques récemment élaborées fin de quantifier ces groupes d'intérêt fournissent un outil permettant non seulement, par la technique TSA-FISH, d'acquérir des informations quantitatives mais également de rechercher des associations hôtes-parasites, notamment par l'utilisation de double marquage (de l'hôte et du parasite), les sondes permettant de cibler les parasites à l'état libre ou intracellulaire dans leur hôte. Ce type d'approche par double marquage peut permettre d'estimer des taux d'infections.

Par ailleurs, suite à des résultats récents nous avons d'ores et déjà des informations concernant les grands groupes d'algues susceptibles d'être associés 'physiquement', ou visiblement infectés, par les parasites du groupe Perkinsozoa ; aussi une approche par isolement de cellules infectées (par micromanipulation notamment) sera mise en œuvre pour progresser sur la question des associations hôtes-parasites. Des méthodes d'amplification du matériel génétique à partir d'une seule cellule ou de quelques cellules isolées (Whole Genome Amplification) seront utilisées pour décrypter les associations d'espèces par des

approches moléculaires (séquençage notamment). Ce type de démarche a été récemment initiée dans le cadre de la thèse de JF Mangot. En parallèle, la mise en œuvre de techniques telles que le Magneto –FISH devrait également être mise à profit pour progresser sur les associations d'espèces eucaryotes.

Les résultats attendus concernant l'identification phylogénétique des parasites et de leurs hôtes pourrait permettre à terme d'aborder la question de la co-évolution en s'interrogeant par exemple sur la proximité phylogénétique des parasites et de leurs hôtes associés : Des parasites proches phylogénétiquement envahissent-ils des hôtes eux aussi phylogénétiquement proches ? Cet aspect du travail pourrait faire l'objet d'une collaboration déjà pré-établie avec l'Unité d'écologie systématique et évolution (Univ. Paris Sud Orsay).

Ce projet s'articule donc autour de quatre axes : (i) poursuivre l'identification, la quantification et l'analyse de la diversité des taxons parasites présents in situ (ii) confirmer le rôle parasite des taxons considérés (Perkinsozoa, notamment) par la mise en évidence d'associations hôtes-parasites, (iii) explorer les différents réservoirs potentiels pour ces taxa parasites, comme les sédiments (iv) mettre en relation la dynamique spatio-temporelle de ces organismes parasites avec celle des communautés planctoniques.

*In fine*, ce travail de recherche s'inscrit à la fois dans une démarche d'exploration de la diversité des eucaryote unicellulaire et de compréhension des interactions biologiques en vue d'alimenter les modèles de fonctionnement des systèmes lacustres.

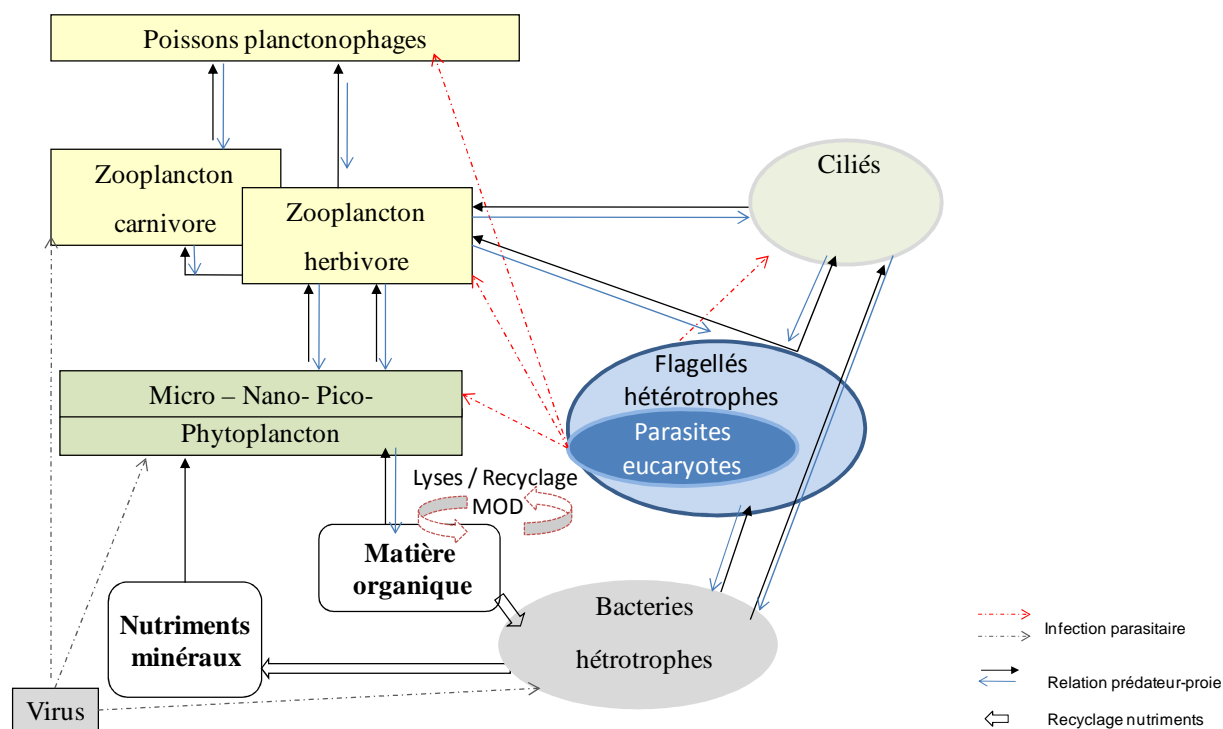


Fig 23. Illustration simplifiée du 'positionnement' des parasites eucaryotes (stades libres zoospores) dans les modèles de réseaux trophiques planctoniques.

### Intérêt du projet et questions posées :

Bien qu'aujourd'hui plus aucun doute ne réside sur l'importance des pathogènes dans les dynamiques des populations planctoniques, l'impact des parasites eucaryotes reste largement méconnu en milieu lacustre et probablement sous estimé. Il s'agit d'une question complexe compte tenu de la diversité des parasites eucaryotes composés de divers groupes phylogénétiques (v. Chap II § 2.2) dont les chytrides, Perkinsozoa, Amoebozoa, Dinoflagellés, Kinetoplastides, connus pour infecter aussi bien les diatomées, les dinoflagellés que les cyanobactéries, les chrysophytes, les cryptophytes, les chlorophytes, les prymnesiophytes, ainsi que les ciliés, les copépodes ... La plupart des études ont été de nature descriptive et très peu d'informations sont acquises sur leur distribution biogéographique, ou, leurs interactions précises dans les réseaux trophiques. De plus, les interactions hôtes/parasites peuvent être d'une complexité variable, avec des possibilités d'avoir plusieurs parasites pour un même hôte, la nécessité de plusieurs hôtes successifs pour le parasite (plusieurs hôtes pouvant appartenir à des niveaux trophiques différents), ou encore l'existence de parasites de parasites (hyperparasitisme).

L'acquisition d'information sur la diversité, le rôle de ces groupes eucaryotes permettrait à terme d'aborder des questions d'écologie fonctionnelle clés :

- L'impact significatif que peuvent avoir les parasites eucaryotes dans le contrôle des successions algales. Le rôle potentiel des parasites eucaryotes dans la régulation des blooms est un point particulièrement intéressant compte tenu des questions clés liées aux proliférations des groupes algaux appartenant principalement aux Cyanobactéries, et éventuellement aux Dinophycées et Diatomées (en milieu marin et côtiers). Ces phénomènes de blooms sont en effet connus pour être nuisibles notamment en raison de possibles déplétions en oxygène, mais également pour la production de toxines. De nombreuses questions se posent encore concernant leur déterminisme (conditions d'initiation de développement, de maintien à l'état de bloom ou de terminaison de bloom). La prise en compte du rôle du parasitisme dans la dynamique des blooms a été explorée principalement en milieu marin ou côtier, et très peu en milieu lacustre. Dans les eaux côtières, des parasites du genre *Amoebophrya*, ou appartenant au groupe des Perkinsozoa comme *Parvilucifera infectans* (parasites de dinoflagellés) sont notamment rapportés comme ayant un impact significatif sur la dynamique des blooms de leurs hôtes. Des données relativement anciennes existent concernant le rôle des champignons parasites (Canter and Lund, 1951 ; Iebling et al, 2004) au travers d'une étude s'intéressant au chytrid *Zygorhizidium planktonicum* et son hôte la diatomée *Asterionella formosa* touchée par des épidémies bi annuelles dans plusieurs lacs allemands. A l'inverse, la présence d'eucaryotes du groupe Perkinsozoa n'avait jamais, ou très rarement, été mis en évidence dans

les écosystèmes lacustres, et peu d'informations sont disponibles concernant leurs hôtes potentiels qui pourraient regrouper divers protistes. *Parvilucifera infectans* (Perkinsozoa) est en effet connu pour infecter 17 espèces appartenant à 10 genres de dinoflagellés en milieu marin (Park et al, 2004). Un eucaryote phylogénétiquement affilié à Perkinsus et Parvilucifera a également été isolé comme parasite de Cryptophytes (Brugerolle, 2002).

- Par ailleurs via les lyses cellulaires massives induites lors des infections parasitaires, la question de relargage et donc recyclage de matière organique et des nutriments minéraux est également posée. Les lysats cellulaires peuvent fournir des ressources en nutriments rapidement ré-assimilables par les organismes phytoplanctoniques ou bactériens (Middelboe et al, 2003).

- Enfin, un aspect récemment mis en évidence concerne le rôle des parasites en tant que ressources nutritives pour les filtreurs (Kagami et al, 2004). En effet, il a été rapporté que les zoospores de champignons, parasites d'espèces phytoplanctoniques, sont susceptibles d'être consommées efficacement par les cladocères filtreurs, et que par conséquent un transfert de nutriments des algues vers le zooplancton pourrait s'établir (mycoloop). Cette Mycoloop pourrait bien concerner non seulement les zoospores de champignons mais également tous les autres groupes présentant des stades libres flagellés.

Ainsi, compte tenu du rôle fonctionnel important qu'est susceptible d'exercer le parasitisme eucaryote, il doit être considéré aujourd'hui avec plus d'attention dans le développement de concepts concernant la dynamique du plancton et les flux de matière dans les réseaux trophiques aquatiques, notamment lacustre. D'autant que les données récentes que nous avons obtenues mettent en lumière la présence de parasites potentiels dont on ne suspectait pas la présence dans les lacs dans de telles proportions. Aussi, il semble pertinent de considérer aujourd'hui l'acquisition de données concernant la diversité des parasites eucaryotes lacustres, leur distribution et les associations hôtes-parasites comme une voie de recherche à privilégier, car ayant des implications notables dans la compréhension du fonctionnement du système lacustre.

#### Intégration du projet aux axes de recherches de l'UMR CARRETEL

Ce projet de recherche s'inscrit dans le contexte général d'étude du fonctionnement écologique des systèmes lacustres et se place au cœur des débats scientifiques sur le rôle fonctionnel de la biodiversité. Les données acquises seront notamment complémentaires des travaux développés sur le parasitisme virale (S Jacquet).

Par ailleurs, ce projet est complémentaire et cohérent avec des actions de recherche organisées plus largement au sein de l'UMR CARRETEL, notamment les suivis limnologiques des trois grands lacs naturels (Annecy, Bourget, Léman) qui sont au centre de l'Observatoire LACS porteur de nombreuses questions concernant les interactions biotiques le poids de la régulation 'par le haut', parasitisme notamment, susceptible d'être fortement structurante pour la dynamique des communautés.

## 2. DETECTION DES ESPECES RARES DANS L'ASSEMBLAGE DES EUCARYOTES UNICELLULAIRES

### Intérêts et Objectifs

La notion de 'rare biosphère' a été révélée chez les procaryotes, notamment par les travaux de Sogin *et al* (2006) qui démontrent que si peu de populations différentes sont dominantes dans les échantillons aquatiques, toutefois, de très nombreuses populations ayant de basses abondances représentent la majorité de la diversité phylogénétique. Par l'utilisation des méthodes moléculaires classiques, les populations dominantes ont masquées la détection des OTUs de faibles abondances qui requière l'analyse d'un nombre bien plus élevé d'amplicons qu'il n'ait envisageable d'en traiter par la méthode de clonage traditionnel. Aussi afin d'estimer correctement la richesse présente dans un assemblage microbien complexe il apparaît nécessaire d'acquérir des données à l'aide de méthodologies adaptées, notamment les méthodes de séquençage massif (pyroséquençage).

A l'instar des observations concernant l'existence d'une 'rare biosphere' chez les communautés procaryotes, l'analyse de la diversité des eucaryotes de petites tailles (< 5µm) qui a été menée dans plusieurs écosystèmes lacustres permet de soulever l'hypothèse selon laquelle des taxa peu abondants, dont les taxa parasites, seraient présents dans les systèmes lacustres **parmi le pool d'espèces rares**, et constitueraient de ce fait **un réservoir** duquel certains taxa sont susceptibles d'émerger en fonction des variations de conditions de l'environnement.

En effet, sur la base des résultats de clonage séquençage (thèse C Lepère), on observe des variations inter-lacs quant à la présence de certains groupes eucaryotes, et également des contrastes quant à la proportion des séquences dans les bibliothèques de clones constituées. De plus, la méthode semi quantitative T-RFLP a permis également de démontrer qu'un petit nombre d'espèces dominait la communauté, tandis que l'essentiel de la diversité eucaryote était représentée par des taxa peu abondants (Lepère et al, 2006), seuls les T-RFs rares étant discriminants pour les écosystèmes que nous avons étudiés. Aussi, ces variations temporelles et/ou inter-lacs de la présence de certains groupes taxonomiques (détectée par clonage séquençage classique) posent la question de leur ubiquité dans les écosystèmes aquatiques. Sont-ils uniquement spécifiques de certains milieux (en lien avec l'état trophique notamment)? Sont ils présents parmi les espèces de faibles abondances, y compris dans les écosystèmes lacustres où ils n'ont pas été révélés jusqu'à aujourd'hui ?

Dans le cadre de ce projet, l'un des objectifs principaux est d'**obtenir une plus grande profondeur de lecture de la diversité eucaryote** ; et **d'explorer la question des espèces rares, notamment en appliquant**

**une méthode de pyroséquençage.** Réaliser pour les Eubactéries, la méthode de '454 tag sequences' est extensible aux Archaea et aux protistes, offrant une opportunité de collecter des données largement plus exhaustives concernant la richesse et le types de micro-organismes présents dans les assemblages microbiens ainsi que leur importance relative. Cette méthode serait appliquée prioritairement à l'identification des eucaryotes lacustres appartenant à la plus petite fraction de taille (<5µm) pour laquelle la connaissance de la composition taxonomique bien qu'incomplète s'appuie déjà sur une base de données de séquences non négligeable ayant permit l'insertion des séquences dans des arbres phylogénétiques. Les données de pyroséquençage seront complémentaires, elles permettront de générer des séquences relativement courtes (400 paires de base) moins propice à une analyse phylogénétique fine, mais suffisamment longue pour procéder l'identification des taxa ; et surtout extrêmement exhaustive de par le nombre de séquences acquises et présentant des informations quantitatives relativement fiable.

Dans un second temps ce type de séquençage massif pourra être appliqué à des échantillons benthiques et de zones pélagiques profondes afin d'acquérir des données plus complètes sur les patrons de diversité des 'pico'-eucaryotes lacustres.

Parallèlement à ces méthodes de séquençage massif, la question des espèces rares, de leurs interactions biotiques et leurs rôles fonctionnels, sera abordée (*in situ* et expérimentalement en microcosmes) par des méthodes de marquage spécifiques (TSA-FISH notamment). Ces outils peuvent permettre de progresser sur la connaissance de la distribution spatio-temporelle (à des échelles variables) des groupes ciblés et des facteurs impliqués dans leurs dynamiques. Des développements méthodologiques de type Magneto-FISH doivent permettre par ailleurs de progresser dans la connaissance des assemblages d'espèces comme cela a été évoqué précédemment. La méthode DNA-SIP couplant outils moléculaires et traçage isotopique également en cours de développement au sein de l'UMR CARTELE pourrait fournir un outil utilisable dans le cadre de ces travaux.

Parmi les espèces identifiées comme étant des 'espèces rares' à l'heure actuelle en milieu lacustre, les taxa appartenant au groupe des LKM11, récemment positionné phylogénétiquement dans le clade des Rozellida par Lara et al (2009), seront plus particulièrement ciblés. Les premières approches quantitatives menées en milieu lacustre sur ce groupe mettent en évidence une présence récurrente au cours de l'année (lac du Bourget, Mangot et al 2009). Aucune indication précise concernant le rôle de ce groupe n'est disponible, à l'exception des hypothèses proposées par Van Hannen et al (1999) rapportant la possible implication des LKM11 dans la décomposition de MO lors de phase de sénescences de diverses espèces phytoplanctoniques. Plus récemment Lara et al (2009) évoquent plus probablement un rôle parasitaire pour ces taxa, hypothèse devant être étayer par des approches écologiques.

## Contexte

On sait aujourd'hui que, non seulement les micro-organismes sont des acteurs majeurs dans les grands cycles biogéochimiques, mais aussi qu'ils représentent le plus grand réservoir de biodiversité.

Qu'il s'agisse des bactéries, des archaea ou des pico-eucaryotes, l'étude des communautés microbiennes a été menée par des méthodes moléculaires dans divers écosystèmes, ce qui a permis de révéler une diversité insoupçonnée. La question du rôle de la diversité microbienne dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes a ensuite très vite émergée. Mais, bien que les approches génomiques et métagénomiques permettent depuis peu d'accéder à des informations concernant le rôle de certains micro-organismes, les étapes de découverte de la diversité phylogénétique, de collecte des données, de mise en évidence de l'identité des micro-organismes sont des étapes descriptives encore en cours. Elles apportent progressivement un éclairage sur la présence et distribution des taxa microbiens ; elles sont un pré-requis indispensable avant de passer à l'élaboration de théories concernant le lien entre diversité et fonctionnement.

Les efforts d'analyses au cours de la dernière décennie ont porté prioritairement sur l'étude des séquences d'acides nucléiques des gènes de l'ARNr 16S permettant de décrypter la diversité des procaryotes. Mais récemment, divers auteurs soulignent les limites des méthodes de clonage séquençage classiques qui conduisent à une sous représentation des espèces rares, alors qu'une estimation largement plus exhaustive de la diversité peut être obtenue par la méthode de séquençage haut débit ('454 Tag sequences' par exemple qui est basée sur l'utilisation d'amplicons PCR de petite taille (< 400 pb) et qui ne requiert pas la construction de bibliothèques recombinantes). Ainsi une diversité plus grande d'un ou deux ordres de grandeur a pu être révélée chez les eubactéries par ce séquençage massif (milieu marin). Ces travaux novateurs ont non seulement permis de prendre conscience que de nombreux taxa bactériens sont encore potentiellement à découvrir ; mais, également qu'une large part de la diversité nouvellement révélée est représentée par des espèces de faibles abondances dont le rôle dans le fonctionnement de l'écosystème et dans l'évolution génétique des communautés est inconnu. L'essentiel des travaux évoqués ci dessus concerne des études ciblant les procaryotes. Les données acquises à partir de l'analyse des gènes de l'ARNr 18S, pour appréhender la diversité des eucaryotes unicellulaires, sont beaucoup plus rares, et en particulier celles utilisant les méthodes de séquençage massif (une seule référence en 2009 : Amaral-Zettler et al, 2009). Il est assez clair aujourd'hui que l'utilisation de la technique du pyroséquençage (efficace en termes de niveau de résolution et de rapidité d'acquisition d'un très grand nombre de



séquences) appliquée aux eucaryotes doit permettre, en s'affranchissant des biais liés étapes de clonage, d'avoir une vision plus exhaustive de la diversité et de révéler l'identité d'espèces rares.

Une analyse de ce type ciblant la fraction eucaryote <5µm a été initiée en 2009 avec l'appui des projets innovants EFPA de l'INRA, dans le cadre d'une comparaison inter lacs (8 lacs différents) à partir d'échantillons prélevés dans l'épilimnion de ces lacs (méthode 454 tag pyrosequençage). Ce type d'analyse devrait être mis en application à partir de 2010 en prenant en compte la dynamique temporelle et spatiales des communautés sur deux lacs, ceci en partie dans le cadre de l'ORE Lacs. Ce dispositif d'**observations à long terme des grands lacs profonds péri-alpins** alimente une base de données déjà largement pourvue (40ans) et constituera le cadre logistique et scientifique des échantillonnages. Les suivis habituellement réalisés sur les lacs péri-alpins concernent les paramètres se rapportant: (i) à la qualité des eaux : données physico-chimiques (N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub>, P-PO<sub>4</sub>, COD) et biologiques (chlorophylle a, phytoplancton, zooplancton) suivis sur des pas de temps mensuels à bi-mensuels (ii) aux populations piscicoles (iii) aux flux émis par certains bassins versants (eau et nutriments).

A partir de 2010, la mise en place **d'échantillonnages relatifs à l'acquisition de données moléculaires (pyrosequençage) permettant de caractériser la composition des assemblages 'pico'planctoniques** (procaryotes et eucaryotes <5µm) en zones pélagiques (et probablement benthiques) permettra de compléter l'analyse des communautés planctoniques. Une banque d'échantillons d'ADN viendra compléter les collections réalisées pour les communautés microphytoplanctoniques et zooplactoniques de ces lacs.

### Collaborations dans le cadre de ce projet

L'acquisition de ces données moléculaires sera effectué en partenariat entre le LMGE (laboratoire impliqué dans l'ORE lacs). La collaboration concerne plus particulièrement l'analyse des données de pyroséquençage (obtention de plusieurs milliers de séquences) qui nécessitent un traitement bioinformatique adapté pris en charge par F. Enault, G. Bronner (Université Blaise Pascal) sous la direction de D. Debroas (LMGE).

### Insertion dans la problématique générale du laboratoire et programmes en cours

Une bonne lecture de la diversité et de la structure des communautés est indispensable pour progresser sur la réflexion concernant les concepts d'écologie générale, notamment la distribution des principaux groupes phylogénétiques, la sélection des espèces, le rôle de la diversité dans le fonctionnement des écosystèmes.

Par ailleurs, la proposition de développement d'un volet microbiologique (banque ADN et analyses de séquençage massif dans le cadre des projets SOERE INSU) inséré dans l'**observatoire des grands lacs profonds péri-alpins**, permettra de compléter les données acquises classiquement concernant la diversité et la structure des communautés micro- et méso-planctoniques ; ce qui doit représenter une plus value pour l'ORE lacs.

### 3. L'ADN FOSSILE, UN OUTIL POUR RECONSTITUER L'EVOLUTION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES LACUSTRES SOUS CONTROLES CLIMATIQUE ET ANTHROPIQUE ? : APPROCHE PALEO-ECOLOGIQUE

#### Objectifs

Les sédiments lacustres présentant des alternances saisonnières peuvent être datés avec justesse (cas du Lac du Bourget) et constituent des systèmes d'archivage naturels pertinents pour reconstituer annuellement l'histoire récente des impacts de l'anthropisation (Arnaud et al, 2005 ; Giguet-Covex et al, 2009). Notamment dans le cas du Lac du Bourget, Giguet-Covex et al 2009 ont montré l'existence de dépôts annuellement laminés dans le Lac du Bourget, qui ont permis d'établir des chroniques de flux de matière en réponse à l'eutrophisation récente (anthropisation) du lac depuis les années 1940 (modifications des flux de phosphore, carbone organique et carbone minéral) et au réchauffement climatique (flux détritique en apporté par les crues du Rhône).

Dans ce contexte, le projet a pour objectif d'utiliser un biomarqueur moléculaire, l'ADN fossile, en tant qu'outils de reconstitution paléo-environnementale **des grands lacs péri-alpins (lac du Bourget prioritairement)**.

Ce projet s'adosse au programme de recherche ANR IPER RETRO (coordonnée par M Perga-UMR CARTELE) visant à étudier les effets de 3 types de facteurs de forçage ayant affecté les grands lacs péri-alpins : les introductions de poissons, les modifications de concentrations en nutriments (eutrophisation puis ré-oligotrophisation) et le changement climatique (réchauffement des eaux). L'étude des réponses à ces perturbations est abordée par une approche pluridisciplinaire combinant les méthodes de la paleolimnologie et de l'écologie. Les structures des réseaux benthiques et pélagiques seront étudiées dans les archives sédimentaires (datées précisément) par une combinaison d'analyses de macro-restes fossiles (cladocères, chironomes, diatomées et œufs de durée du zooplancton) et de marqueurs moléculaires (pigments photosynthétiques et acides gras). Le projet proposé ici apporte donc un **volet exploratoire concernant spécifiquement l'analyse de l'ADN fossile, en vue de l'obtention de profils génétiques reflétant l'archivage de 'restes moléculaires' des communautés microbiennes passées**. L'obtention de données moléculaires reflétant l'évolution des assemblages phytoplanctoniques (diatomées et cyanobactéries notamment) est privilégiée.

L'utilisation de l'ADN fossile représente une approche très complémentaire des analyses faites sur les autres biomarqueurs : lipides, pigments, 'restes d'organismes' puisque les 'macrorestes' visibles ne sont pas utilisables pour tous les groupes d'organismes, l'ADN peut permettre de révéler une diversité non observable sur les 'restes' d'organismes ou les cellules enkystées

Le projet s'inscrit à la fois dans une démarche d'observation de l'histoire récente (150 ans) des systèmes lacustres tempérés et, de mise en œuvre de nouveaux 'paléo-indicateurs'. Le premier point permettra, grâce à l'utilisation des archives sédimentaires, d'augmenter la profondeur de champs des observations habituellement faites *via* les suivis environnementaux (ORE lacs) et d'en compléter les données lacunaires. Le second permettra de poser les bases de nouveaux outils de diagnostic des trajectoires évolutives des lacs.

### Contexte, intérêts et aspects innovants

Les composés organiques fossilisés sont susceptibles d'être utilisés pour reconstituer les modifications de composition des assemblages planctoniques microbiens (Volkman et al 1998; Schouten, et al 2001) au cours du temps. Il est alors possible de retracer l'impact des changements environnementaux sur la diversité des communautés microbiennes lacustres.

L'acquisition de données moléculaires issues d'ADN fossile constitue une nouvelle étape très attendue dans les études paléoenvironnementales via les sédiments lacustres qui sont des géomarqueurs performants pour appréhender les effets du climat et de l'anthropisation. Le couplage, au sein d'une même archive continentale, de données de sédimentologie et d'écologie issues de biomarqueurs (ADN et lipides en particulier) constitue une valeur ajoutée certaine dans les reconstitutions environnementales et ouvre clairement de nouvelles perspectives de recherche.

L'un des biomarqueurs pouvant apporter une information taxonomique précise sur l'identité des communautés 'archivées', est l'ADN, et notamment les gènes codant pour l'ARN ribosomique (Small SubUnit rRNA) dont les séquences fournissent une information fiable quant à l'identité des espèces (par comparaisons phylogénétiques avec les banques de données génomiques). Ces approches moléculaires (basées sur l'extraction d'ADN, l'amplification des gènes codant pour l'ARNr par exemple, et le séquençage) ont récemment permis, notamment dans le cas du lac du Bourget, de révéler la diversité de groupes phylogénétiques présents dans l'assemblage planctonique eucaryote (algues ou hétérotrophes unicellulaires) (Lepère et al 2008). L'objectif est ici de transposer ce type d'outils moléculaire à l'analyse de profils de sédiments datés du lac du Bourget.

Jusqu'à récemment, l'ADN était considéré comme étant à priori largement dégradé dans les sédiments (à l'exception de sédiments présentant des conditions de préservation particulières (permafrost)), mais, récemment plusieurs études ont utilisées avec succès l'extraction d'ADN ancien pour obtenir des profils génétiques reflétant l'archivage de 'restes moléculaires' des communautés microbiennes passées (Coolen et al 2004 ; Sorensen & Teske 2006). Ces études ont été réalisées sur divers types sédiments, en milieu marin

et en milieu lacustre, et ont abouti à l'obtention de profils génétiques, même en l'absence de macrofossiles, en ciblant l'ADN des communautés procaryotes ou eucaryotes.

Des questions méthodologiques concernant notamment l'optimisation des protocoles afin de minimiser les risques de contamination par de l'ADN récent ont été explorées et largement éclairées (Coolen et al 2004).

L'un des points méthodologique critique en ce concerne l'utilisation de l'ADN fossile comme traceur est la préservation de l'ADN dans les sédiments. En effet, ADN et ARN sont des molécules relativement fragiles qui peuvent être 'dégradées' sous l'effet d'Attaque bactérienne ou fongique, de l'Action d'enzymes (nucléases), de réactions chimiques spontanées (oxydation, hydrolyses ...), la préservation à long terme dépend de facteurs multiples tels que le pH, les facteurs d'oxydation, la température, et également les taux de sédimentation. Les lacs méromictiques, ou lacs profonds (fonds anoxiques) avec des taux de sédimentation élevés, sont à priori des milieux assez favorables à la préservation de l'ADN, et dans les lacs profonds, et en milieu marin, même si une partie de l'ADN est susceptible d'être dégradé avant que les cellules mortes n'atteignent les sédiments, il est aujourd'hui démontré que le matériel génétique peut être stocké et bien préservé ; il peut même être moins propice à l'altération diagenétique que d'autres marqueurs comme certains lipides.

Les essais préliminaires que nous avons réalisés sur les sédiments du lac du Bourget ont montré l'efficacité de l'extraction d'ADN en quantité et qualité satisfaisantes pour pratiquer une analyse moléculaire. La possibilité d'amplifier, cloner et séquencer le matériel génétique extrait a été vérifiée en deux points d'une carotte sédimentaire. Différentes amorces PCR (ciblant les plastes, les cyanobactéries, les diatomées) ont été testées au cours d'un projet exploratoire (2009). Ces premiers résultats montrent que les restes moléculaires de divers groupes phytoplanctoniques sont retrouvés: *Synurophyceae*, *Chrysophyceae*, *Bacillariophyta*, *Rhizaria*, *Viridiplantae*, *Alveolata*, *Amoebozoa*, *Fungi*, *Haptophyceae* et *Cyanobacteria*. Alors que l'acquisition des séquences d'ADN subfossile est particulièrement attendue et prometteuse dans le domaine de la paléoécologie (Sorensen & Teske 2006 ; Decaestecker et al 2007), nos essais préliminaires nous permettent d'aborder ce travail innovant avec une prise de risque limitée.

Il semble donc que l'acquisition de données moléculaires puisse permettre la reconstruction de l'impact des changements environnementaux sur les populations microbiennes (phytoplanctoniques notamment), et particulièrement en combinant l'ADN à d'autres biomarqueurs (Coolen et al 2004) tels que les biomarqueurs lipidiques. Les cortèges lipidiques constituent des biomarqueurs susceptibles de fournir une signature des communautés phytoplanctoniques (Volkman et al 1998), et dans le cadre d'une collaboration avec J Jacob (laboratoire ISTO Univ Orléans), une phase exploratoire de ce projet a permis

de tester la complémentarité entre ADN et Lipides à partir d'échantillons sédimentaires du lac du Bourget. Ces résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence différents stérols et cétones stéroïdiennes en quantité et variété importante. L'évolution de leurs proportions relatives dans le sédiment indique que ces biomarqueurs moléculaires sont les plus adaptés pour répondre à notre problématique. L'étude des biomarqueurs lipidiques (certains étant caractéristiques de groupes phytoplanctoniques) apportera des informations complémentaires aux données 'ADN fossile'. En particulier, l'évolution des stérols et cétones stéroïdiennes (quantité et qualité) sera prise en compte pour révéler les changements d'état trophique du milieu. L'analyse isotopique effectuée sur ces composés spécifiques ( $\delta^{13}\text{C}$  des stérols et cétones stéroïdiennes) est en parallèle une approche prometteuse afin de tracer l'origine du C (prise en charge par M Perga (CARRTEL) et J Jacob (ISTO)).

### Approches méthodologiques

Dans le cadre ce projet, il est prévu de cibler plus particulièrement le matériel génétique phytoplanctonique, pour ceci des méthodes moléculaires (extraction ADN, PCR, Clonage Séquençage) précédemment utilisées en milieu planctonique, vont être mises en application pour l'étude des archives sédimentaires du lac du Bourget.

Des adaptations sont nécessaires à l'analyse d'ADN ancien. Notamment des critères d'authentification sont requis. Ces critères combinent des aspects méthodologiques relevant (1) simplement de la mise en application de protocoles de décontamination des zones de travail, d'utilisation de multiples 'blancs-contrôles' au cours des manipulations ; (2) de l'obtention d'une reproductibilité de résultats par des analyses inter laboratoires (mêmes échantillons traités par des laboratoires différents) (3) de test 'âge de l'ADN' tel que proposé par Hebsgaard et al (2004), analyse réalisable notamment via la plateforme Palgene de paléogénétique (ENS Lyon).

Les objectifs sont plus particulièrement de :

- (1) Quantifier l'ADN Total (et des pigments caractéristiques des organismes phototrophes):
  - . Quelles variations observe t on dans les quantités extraites sur un profil vertical (intra-lac , et inter-lacs)?
  - . Quels liens existent-ils entre les variations temporelles et les facteurs de forçage connus ?
- (2) Identifier les unicellulaires dont l'ADN est fossilisé : Le matériel génétique phytoplanctonique sera plus particulièrement ciblé par utilisant d'amorces permettant de cibler l'ADN plastidial (tous les groupes pigmentés étant alors recherchés), les cyanobactéries, les diatomées.

L'objectif en ciblant des groupes tels que les diatomées ou les cyanobactéries est de se focaliser sur des groupes bio-indicateurs, et d'apporter une identification précise des taxa archivés au travers du couplage entre analyses du 16S et des ITS par exemple pour les cyanobactéries.

La méthode de séquençage (après PCR –Clonage) sera l'outil principal d'analyse de diversité, mais il pourrait être associé à des méthodes d'empreinte moléculaire (DGGE) afin de sélectionner certains échantillons sédimentaires en vue de leur séquençage (les échantillons présentant des profils de diversité clairement divergents seront prioritairement séquencés). Des essais de PCR quantitative devraient être initiés en 2010 afin de cibler certains groupes spécifiques (les cyanobactéries *Plankthotrix* dans les sédiments du lac du Bourget notamment) ; ce travail sera effectué dans le cadre de l'accueil d'un post doctorat (Dr O Savishcheva).

Les analyses de pigments fossiles (Chlorophylle *a*, Lutéine-zeéaxanthine, diatoxanthine, myxoxanthophylle, fucoxanthine) par HPLC seront effectués sur les mêmes échantillons afin de compléter l'analyse des restes d'organismes phototrophes.

#### Collaborations dans le cadre de ce projet

La faisabilité du projet repose sur le fait que projet exploratoire bénéficiera d'un soutien logistique du programme IPER-Retro (ANR VMCS), l'échantillonnage et la datation des carottes de sédiments seront réalisés dans le cadre de ce projet coordonné par M Perga (CARRTEL). Par ailleurs une aide financière dans le cadre des projets PEPS du CNRS (projet ADN messenger) a été obtenue en collaboration avec F Arnaud (EDYTEM) en 2009. Ce projet a également permis une collaboration avec J. Jacobs (ISTO) Université d'Orléans, concernant l'analyse des biomarqueurs lipidiques.

Ce projet par ailleurs donne lieu à l'encadrement de deux post doctorants d'une durée de 1 an (2010).

Les projets présentés ci avant (§1, 2, 3) sont des projets pour lesquels mon implication sera majeure.

En parallèle, un projet de recherche développé en synergie au sein de l'équipe BioFEEL, sera en construction au cours des 2 années à venir. L'objectif de ce projet est de progresser dans la connaissance de l'utilisation des matières organiques par les réseaux trophiques dans les grands lacs péri-alpins (voir annexe 1 extraite du document 'perspectives 2010-2014-Equipe BioFEEL' présenté à l'AERES). La question générale est celle de la contribution du carbone d'origine terrestre au métabolisme des lacs clairs péri-alpins. Il s'agit d'une question abordée dans le cadre d'un projet transversal (inter équipes) au sein de l'UMR CARRETEL et en lien avec la Fédération de recherche FLAME associant CARRETEL, et LCME, EDYTEM, 2 laboratoires de l'Université de Savoie regroupant des chercheurs spécialisés en chimie environnementale, géochimie, et sédimentologie.

Par ailleurs, parmi les programmes de recherche s'établissant actuellement à l'interface de différentes équipes de l'UMR CARRETEL, mon implication concernera un programme visant à étudier les impacts des efflorescences de cyanobactéries toxiques sur les maillons trophiques supérieurs (zooplancton et poissons dans le lac du Bourget). Ce programme est initié depuis sept 2009 dans le cadre d'un programme Cible région Rhône Alpes, il donne lieu à un co-encadrement de thèse avec O. Anneville (équipe RITOXE de l'UMR CARRETEL).

L'ensemble des projets présentés dans les perspectives de recherches s'inscrit dans les champs thématiques du département INRA EFPA, en particulier CT 1 et CT 2 (respectivement : Fonctionnement des écosystèmes et des cycles biogéochimiques ; Interactions entre espèces au sein des écosystèmes). Par ailleurs, leur faisabilité repose en partie sur des projets financés, également sur des projets qui ont été soumis à financement ou le seront en 2010. Ces projets s'appuient sur les collaborations préétablies présentées dans la chapitre IV (chapitre suivant), et pour certains visent à développer un travail inter-équipes au sein de l'UMR CARRETEL.

# Animation Scientifique et pédagogique



## 1. GESTION DE LA RECHERCHE ET TRANSFERT

### 1.1 Expériences d'encadrements, de gestion de projets, d'animation scientifique

C'est l'envie de me consacrer pleinement au développement de projet de recherche, à l'encadrement et à l'animation scientifique qui a motivé ma candidature au poste de chargé de recherche INRA, et les expériences que j'ai eues dans ce domaine ont largement contribué à engager la démarche d'inscription en HDR.

#### ◆ Encadrements de travaux de recherche

Au cours des 8 dernières années, j'ai pu acquérir une expérience d'encadrement des travaux de recherche de niveau doctorat et récemment post doctorat. Par ailleurs j'ai depuis peu l'occasion de réaliser un exercice de formation à la recherche un peu différent, avec l'accueil d'un étudiant de master en alternance dont je suis le maître d'apprentissage.

#### - THESES CO ENCADREES -

- Cécile Lepère 2003-2006 *Thèse soutenue le 17 avril 2007 Financement: Contrat de Recherche*  
Diversité, dynamique et facteurs de régulation des picoeucaryotes dans les écosystèmes lacustres. Co-encadrement avec : Pr D. Debroas (Univ. Blaise Pascal – UMR CNRS 6023)
- Sébastien Personnic 2003-2007 *Thèse soutenue le 4 oct. 2007 –Financement: Bourse MNRT*  
Dynamique des communautés microbiennes et impacts des virus sur les bactéries auto- et hétérotrophes en milieu lacustre. Co encadrement avec S Jacquet (CARRTEL INRA) et D Fontvieille (Univ. de Savoie)
- Jean François Mangot : 2007-2010 - *Financement de thèse : Bourse Région Rhône Alpes*  
Les parasites eucaryotes du phytoplancton lacustre : Diversité et Dynamique  
Co-encadrement avec Pr D. Debroas (Univ. Blaise Pascal – UMR CNRS 6023)
- Lyria Berdjeb : 2006-2010 - *Financement de thèse : Financement gouvernement Algérien*  
Effet des virus et protistes flagellés sur les ressources nutritives et la dynamique et structure des communautés bactériennes lacustres. Co-encadrement avec S. Jacquet (CR- UMR CARRTEL)
- Benoit Sotton : 2009-2012 - *Financement de thèse : Bourse Région Rhône Alpes*  
Effet des blooms à cyanobactéries sur les communautés piscicoles lacustres. Co-encadrement avec: O. Anneville (CR- UMR CARRTEL-INRA) et J. Guillard (IR – UMR CARRTEL –INRA)

#### - POST DOCTORANTS -

- Olga Savishcheva : 2010-2011 - *Financement Accueil chercheur étranger INRA (EFPA)*
- Amy Kirkham : 2010 - *Financement Post doc ANR Iper Retro*  
Développement de l'ADN fossile en tant qu'outil de reconstitution paléo-environnementale lacustre.

#### - MASTER EN ALTERNANCE -

- Clément Villar : Sept 2009-Sept 2011 Master Chimie Biologie : aspects analytiques Univ. de Strasbourg  
L'objectif est ici d'accueillir un apprenti en alternance durant 2 ans pour assurer sa formation aux techniques moléculaires utilisées dans les approches environnementales, et aux analyses chimiques d'évaluation de la qualité de l'eau. Mon rôle de maître d'apprentissage est exercé en particulier dans le cadre du plateau technique Biologie moléculaire, et plus généralement dans la formation de l'apprenti à la démarche scientifique appliquée en milieu lacustre.

- DEA et MASTER 2 -

Master Recherche Biodiversité et fonctionnement des écosystèmes Univ. B.Pascal Clermont

- Christophe Bouvier : 2007 Etude d'un groupe eucaryote parasite (Perkinsozoa) en milieu lacustre  
DEA Océanographie et Environnement Marin Université Pierre et Marie Curie Paris VI
- Lyria Berdjeb : 2006 Co-encadrement S. Jacquet (INRA) Effet des virus et des protistes flagellés sur les ressources nutritives et sur la dynamique et la structure de la communauté bactérienne lacustre

DEA Gestion des Espaces Montagnards Université Joseph Fourier Grenoble

- Abdourahmane Mabde Sene : 2003 Impact de la prédation planctonique sur les communautés microbiennes lacustres
- Jérôme Comte : 2002 : Etude préliminaire du réseau trophique microbien sur le lac du Bourget

- STAGIAIRES DE 1<sup>ER</sup> CYCLE UNIVERSITAIRE -

Mon activité de formation à la recherche a bien sûr également concerné l'accueil de stagiaires (4) de niveaux IUT (génie Biologique) ou L3 pro (environnement).

◆ **Responsabilité d'équipe et de programmes de recherche**

Si dès mon intégration au sein de l'UMR CARRETEL j'ai pu participer à différents programmes de recherches dont les principaux sont listés ci après, c'est au cours des 4 dernières années que j'ai pris la responsabilité de programmes de recherche (EC2CO CYTRIX et programme Cibles Blancs région Rhône Alpes, Projet Innovant INRA). J'ai fait le choix de favoriser le travail en équipe au travers de la participation ou coordination de ces programmes de recherche et, également au travers de l'animation de l'équipe BioFEEL, l'une des 3 équipes de recherche de l'UMR CARRETEL.

Cette équipe a été réorganisée en mai 2008, en vue de regrouper des compétences complémentaires centrées sur le fonctionnement des réseaux trophiques pélagiques avec pour but de progresser sur les connexions existant entre réseaux microbiens et réseaux trophiques supérieurs. Des interactions existaient avant cette restructuration, et se poursuivent aujourd'hui, sur la thématique de l'écologie microbienne (plusieurs projets en cours ou échus), et sur les traçages trophiques. Par ailleurs la structuration de cette équipe s'est également opérée au travers du projet 'paléo écologie' (ANR IPER RETRO, coordonatrice M Perga) pour lequel ma participation se fait au travers du développement de l'outil ADN fossile. Actuellement une synergie concrète s'opère entre les membres de l'équipe se traduisant par une convergence au niveau des outils d'analyses et surtout de questions scientifiques. Notamment un projet commun est en construction autour des travaux relatifs aux voies d'utilisation des matières organiques dans les réseaux trophiques, et à plus particulièrement au rôle du carbone terrestre dans le fonctionnement du système pélagique.

- RESPONSABILITE D'EQUIPE -

Responsable de l'Equipe BIOFEEL (Biodiversité, Fonctionnement et Evolution des Ecosystemes Lacustres) depuis Mai 2008 Chercheurs impliqués : Perga M (CR2), Jacquet S (CR1, HDR), Tadonlélé R (CR1), Domaizon I (MCF).

Nombre doctorants dans l'équipe en 2009-2010 : 5

Nombre de post doctorants dans l'équipe en 2009-2010 : 2

*Responsable du Plateau Technique Biologie Moléculaire (depuis Dec 2009)*

*Personnel impliqué sur le plateau : Leberre B (AI), Chardon C (TR), Villar C (master alternance).*

### - RESPONSABILITE DE PROGRAMMES DE RECHERCHE EN COURS -

- ❑ Programme INSU EC2CO CYTRIX (2006- 09) Diversité Rôle des parasites eucaryotes lacustres
- ❑ Projet Blanc CIBLE Région Rhône Alpes (2007- 2010) Les parasites viraux et eucaryotes du phytoplancton lacustre : Diversité et Dynamique

Responsable des projets : DOMAIZON Isabelle

Participants : UMR CNRS 8079 Ecologie, Systématique et Evolution Univ. Paris sud Orsay : MOREIRA D.  
UMR CNRS 6023 Labo. de Biologie des protistes Clermont II : DEBROAS D.  
UMR CARTETEL Station INRA Thonon les bains : JACQUET S.

- ❑ Programme Innovant EFPA INRA (2009) Détection des espèces rares dans les assemblages eucaryotes unicellulaires

Responsable des projets : DOMAIZON Isabelle

Participants : UMR CNRS 6023 Labo. de Biologie des protistes Clermont II : DEBROAS D., ENAULT F., BRONNER G.

### - PARTICIPATION A PROGRAMMES EN COURS OU ECHUS -

- ❑ Programme ANR VMCS : 'IPER RETRO' (2008- 11) *Responsable:* Perga M. (UMR 42 CARTETEL INRA) Impact des Perturbations anthropiques sur les Réseaux Trophiques : Approche paléo-écologique  
Rôle dans le projet : Utilisation des biomarqueurs (ADN fossile comme paléo traceur).

- ❑ Programme PEPS CNRS : 'ADN messenger' (2009) *Responsable:* Arnaud F. (EDYTEM- U. de Savoie)  
Rôle dans le projet : Utilisation d'ADN fossile pour reconstituer l'évolution historique des communautés microbiennes lacustres sous contrôles climatique et anthropique

Participants : UMR CNRS 5204 EDYTEM Univ. De Savoie

UMR CNRS 6113 ISTO Univ Orléans: Jacob J.

- ❑ Programme ANR-IFB Biodiversité 'AQUAPHAGE' (2007-10) *Responsable:* Weinbauer M. (UMR 7093) Relations entre diversité procaryotique et virale au sein de différents environnements aquatiques  
Rôle dans le projet : Estimation de l'effet des protistes bactériovores sur la diversité procaryotique

- ❑ Programme ACI-FNS : ECCO 'VIRULAC' (2004) *Responsable:* Sime Ngando T (UMR 6023)

- ❑ Programme ACI-FNS : ECCO 'DYLACHEM' (2005) *Responsable:* VIOLIER E (UMR 6023)

Rôle dans le projet : Prise en compte de la diversité et l'activité des protistes bactériovores dans les réseaux trophiques planctonique

- ❑ Programme Européen 'EUROLAKES' (2000-2003) Integrated Water Resources Management for Deep European Lakes *Responsable:* Dr. Kurt Duwe, Annette Hallerberg Hydromod (Germany)

Rôle dans le projet : participant worckpackage 'Microbial Diversity'

### - AUTRES COLLABORATIONS -

Membre du Groupement De Recherche 'Réseaux Trophiques Aquatiques' (2006 – 2008)

*Responsable du GDR* : Bezaud Mostagir UMR 5119, Université Montpellier II

- Participation au Programme VIRBAC (2006) site expérimental MEDIMEER (lagune de Thau- France) Effets des UV et de la température et des nutriments sur le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens.
- Participation au Programme VIRDAK (2007) Dakar Sénégal Effets de la salinité sur l'organisation et le fonctionnement du réseau trophique microbien.

Mission scientifique Institut Limnologie d'Irkoutsk – Lac baïkal (Russie) (oct 2006)

*Responsable de la mission* : Natalia Melnik Institut Limnologie d'Irkoutsk

### - PARTICIPATION A ORGANISATION DE COLLOQUE -

- Membre du comité d'organisation et scientifique du Colloque 'Autour du Lac du Bourget' Mai 2005
- Coéditrice des actes du colloque 'AUTOUR DU LAC DU BOURGET'

## 1.2 Contacts et réseaux scientifiques (externes et internes à l'UMR CARRETEL)

Mes travaux de recherche m'ont permis d'établir un réseau scientifique regroupant des scientifiques spécialistes de l'écologie microbienne aquatique, et plus largement des écosystèmes lacustres, mais également des scientifiques d'autres domaines qui m'ont permis d'aller vers une vision plus intégrative du fonctionnement des systèmes et de transposer des méthodes ou approches d'un milieu d'étude à un autre.

Tout d'abord, **un partenariat solide existe avec l'équipe 'Microbiologie de l'environnement et bioinformatique'** (animée par D. Debroyas) du **LMGE** (Université Blaise Pascal Clermont II). Cette collaboration a donné lieu au co-encadrement de 2 thèses, à 2 projets de recherche dont je suis coordinatrice, et un projet ANR blanc déposé en fev 2010 (coordinatrice I Mary). Au sein de ce laboratoire, des connexions fortes existent également avec l'équipe 'Virus et Métabolismes microbiens', via des projets de recherche coordonnées par T Sime Ngando.

Parmi le réseau plus élargi, **les collaborations établies concernent :**

❖ des **scientifiques s'intéressant à la place des eucaryotes unicellulaires ou plus largement des micro-organismes dans les réseaux planctoniques, que ce soit :**

(1) à une échelle moléculaire, pour aborder les questions de phylogénie et de co-évolution phylogénétique: **D Moreira de l'Unité d'écologie systématique et évolution** (UMR CNRS 8079 Univ. Paris Sud Orsay) via son implication dans le projet CYTRIX EC2CO INSU.

(2) à l'échelle de l'écologie fonctionnelle pour progresser dans la compréhension du rôle des communautés microbiennes dans la dynamique des communautés planctoniques :

- En tant que membre du **Groupe de Recherche 'Réseaux Trophiques Aquatiques'** j'ai eu l'occasion de collaborer avec des chercheurs de l'UMR 5119 Ecolag (Montpellier II), de l'UR CYROCO 167 de l'IRD (aujourd'hui intégrés à ECOLAG), de l'UMR LIENSs 6250 (La Rochelle).

Ce GDR, animé par Behzad Mostajir (Ecolag), a eu pour objectifs de fédérer des chercheurs autour de la question des 'Réponses des Réseaux Trophiques Aquatiques aux forçages environnementaux et conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes aquatiques'. Dans ce cadre là, ma participation à deux programmes (programme VIRBAC - site expérimental MEDIMEER -lagune de Thau, et, programme VIRDAK - Sénégal) a donné lieu à des valorisations en commun sous forme de communications et d'articles soumis (A18) ou en préparation.

- De manière plus ponctuelle la collaboration avec l'**EAWAG** (Zurich) et plus spécifiquement avec M. Gessner a également donné lieu à un travail en cours de valorisation.

(3) à l'échelle de l'écologie fonctionnelle pour progresser dans la compréhension du rôle des parasites eucaryotes : Au cours des 3 dernières années, des liens ont été tissés avec la **station biologique de Roscoff**, et plus particulièrement **L Guillou** (UMR CNRS 7144) qui développe des études sur les parasites du plancton en milieu marin et côtiers. Des échanges fructueux se sont effectués notamment via les thèses de C Lepère (soutenue en 2007) et JF Mangot (en cours).

❖ **Sur un plan pluridisciplinaire**, l'appartenance à un UFR pluridisciplinaire m'a très certainement permis de mieux mesurer l'importance et l'intérêt de franchir les limites de nos disciplines propres. J'ai pu, au travers d'échanges informels ou dans le cadre de projet fédérateur, établir des liens entre mes questions de recherche propres et d'autres processus s'opérant dans ou à l'extérieur du système lacustre : transfert des matières depuis le bassin versant, processus pédologiques, sédimentologie, paléolimnologie. Ceci a été possible au travers de collaboration avec le **laboratoire EDYTEM** (Univ de Savoie), ou même au sein de l'UMR CARRTEL via des interactions avec l'Equipe 'Transferts et Bassin versants'. L'UMR CARRTEL est en effet un laboratoire propice à cette démarche d'ouverture de par le fait que se côtoient au sein de la même unité à la fois des compétences ciblées sur les communautés aquatiques (microbiennes ou macroscopiques), sur les transferts de nutriments et matière organique s'effectuant depuis le sol, sur les aspects chimiques de la qualité de l'eau.

❖ **Autres collaborations intra-CARRTEL:**

Une place est prévue parmi les projets à venir, pour favoriser le développement de projets transversaux au sein de l'unité de recherche (contribution de la boucle microbienne aux maillons trophiques supérieurs, contribution d'apports allochtones au fonctionnement des réseaux microbiens). Ce souhait et mon intérêt à travailler à l'interface entre les différentes équipes s'est traduit récemment par une participation active à des projets transversaux déjà initiés (projets structurant de l'UMR CARRTEL) ou en cours de développement (actuellement dans le cadre du projet initié par O Anneville et J Guillard (Equipe RITOXE) concernant l'impact des efflorescences à Cyanobactéries sur les populations de poissons.

### 1.3 Activités scientifiques administratives et d'évaluation

#### - CONSEILS ET COMMISSIONS -

- ❑ **MEMBRE DU CONSEIL NATIONAL DES UNIVERSITES SECTION 67** - nommée depuis Nov 2007
- ❑ **MEMBRE ELU AU CONSEIL D'UFR CISM** Université de Savoie (2002-2005)
- ❑ **MEMBRE DE COMMISSION DE SPECIALISTES** Université de Savoie - Université B Pascal (2001-2008)

- MEMBRE DE JURY DE THESE -

**EXAMINATEURS JURY DE THESE :**

MASQUELIER S., 2009 - Distribution des principaux groupes d'eucaryotes de petite taille en milieu marin et lacustre. Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie spécialité Oceanologie biologique- Station Biologique de Roscoff

ROLLAND A., 2009 - Dynamique et diversité des populations phytoplanctoniques du lac-réservoir Marne du bassin de la Seine. Thèse de l'Université de Savoie, 259 p.

VILLENEUVE A., 2008 - Effets conjoints de facteurs physiques (lumière et hydraulique) et chimiques (pesticides) sur la structure et la composition du périphyton . Thèse Université de Savoie. Spécialité : Biologie des populations. 223 p.

FORASACCO E., 2005 - Ecology and morphofunctional adaptations in some species of genus *Simocephalus*. Thèse Université de Milan – Université de Savoie, 196 p. 14 Juin 2005. Italie

-- ACTIVITE DE REVUE D'ARTICLES -

'**Reviewer**' notamment pour les journaux : FEMS Microbiology Letters, Water Quality Research Journal of Canada, Acta Oecologia, Revue des Sciences de l'eau.

## 2. ACTIVITES PEDAGOGIQUES ET ADMINISTRATIVES LIEES A L'ENSEIGNEMENT

### 2.1 Activités d'enseignement universitaire

✓ **Université de Savoie** 2000-2005 et de 2007 à 2009

**Statut : MCF**

Volumes horaires et Domaine enseigné : Volume horaire 192h équivalent TD / an au minimum

**Licence3 et Master 1 "Gestion des milieux de Montagne" :** Dynamique des Populations, Ecologie Aquatique

**Master 1 : Chimie de l'environnement :** Biologie appliquée à l'environnement

**Licence 1, 2, 3 Sciences de la vie :** Dynamique des populations, Biologie du développement; Ecologie des milieux d'altitude, Microbiologie, Bureautique Informatique

✓ **Université Blaise Pascal (Clermont II).**

**Statuts et volumes horaires**

Sept 1998-Sept 1999 : Enseignante Vacataire (72h eq TD )

Sept 1997-Sept 1998 : Attachée Temporaire à L'Enseignement et la Recherche (99 h eq TD)

Janv 1997-Sept 1997 : Attachée Temporaire à L'Enseignement et la Recherche ( 65h + 39 h eq TD )

Sept 1996-Janv 1997 : Enseignante Vacataire (81,3 h eq TD)

Sept 1995-Sept 1996 : Enseignante Vacataire (60 h eq TD)

Domaine enseigné

DEUG 2<sup>ème</sup> année Sciences Naturelles et Biologie Cellulaire (Module Eaux Courantes) ; DEUG 2<sup>ème</sup> année Sciences de la Terre (Module: Rôle des organismes dans les cycles biogéochimiques) ; LICENCE Biologie des Organismes (Module Biologie animale) ; LICENCE BGST (UE : Ecologie) ; MAITRISE Biologie des Populations et des Ecosystèmes (Options Gestion des écosystèmes aquatiques et écotoxicologie de l'environnement ; écosystèmes aquatiques) ; MAITRISE BGST (Module Biologie animale).

## 2.2 Responsabilité de filières

De Septembre 2007 à Septembre 2009 : **Responsable d'année de formation Master 1 Biologie EPGM**  
(Environnement gestion protection des milieux de Montagne) Université de Savoie

## 2.3 Autres activités pédagogiques

**Encadrement d'étudiant niveau Master2 dans le cadre du 1<sup>er</sup> 'World Student Environmental Summit'** à Kyoto (Japon) du 19 juin au 22 juin 2008.

Ce sommet a eu pour but de formaliser (sous forme d'un document soumis au ministre de l'environnement) les réflexions et propositions d'étudiants (11 pays différents) concernant l'importante question du changement climatique et du développement durable.

Etudiantes encadrées : Gilibert M. – Tardy M.

### **Membre du comité scientifique d'expertise Fête de la science Rhône Alpes**

2004 et 2005 : Expertise des dossiers Fête de la Science à la demande de la délégation Régionale à la recherche et à la technologie Rhône Alpes

### **Présentation de Séminaires au sein de la station INRA de Thonon les bains**

- 2004 : La Mixotrophie chez les protistes aquatiques
- 2007 : Les eucaryotes unicellulaires dans les réseaux trophiques planctoniques : Diversité taxonomique et fonctionnelle
- 2008 : Bactéries hétérotrophes et Matières organiques en milieu lacustre
- 2008 : Les Unicellulaires eucaryotes planctoniques : Diversité eucaryote et Nouvelle fonctions putatives

**Publications  
et  
Communications**



**ARTICLES DANS REVUES A COMITE DE LECTURE REPERTORIEES DANS ISI WEB OF KNOWLEDGE****2009**

(A15) Mangot J.-F., Lepère C., Bouvier C., Debroas D., Domaizon I. (2009) Community structure and dynamics of small eukaryotes (<5 µm) targeted by new oligonucleotide probes: a new insight into the lacustrine microbial food web. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (19), 6373-6381.

(A14) Personnic S., Domaizon I., Dorigo U., Berdjeb L., Jacquet S. (2009) Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio- and picophytoplanktonic abundances in three peri-alpine lakes. *Hydrobiologia*, 627 (1), 99-111.

(A13) Personnic S., Domaizon I., Sime-Ngando T., Jacquet S. (2009) Seasonal variations of microbial abundances and virus- vs. flagellate-induced mortality of picoplankton in three peri-alpine lakes. *J. Plankton Res.* 31(10), 1161-1177

**2008**

(A12) Lepère C., Domaizon I., Debroas D. (2008) Unexpected importance of potential parasites in the Composition of the freshwater small eukaryotes community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, p. 2940-2949.

(A11) Sime-Ngando T., Colombet J., Personnic S., Domaizon I., Dorigo U., Perney P., hustache J.-C., Viollier e., Jacquet S. (2008) Short term variations in abundances and potential activities of viruses, bacteria and nanoprotoists in Lake Bourget. *Ecol. Res.*, 23, 851-861.

**2007**

(A10) Jacquet S., Domaizon I., Personnic S., Sime-Ngando T. (2007) Do small grazers influence virus-induced mortality of bacteria in Lake Bourget (France)? *Fundam. Appl. Limnol. Arch. Hydrobiol.*, 170 (2), 125-132.

(A9) Lepère C., Domaizon I., Debroas D. (2007) Community composition of lacustrine small eukaryotes in hyper-eutrophic conditions in relation to top down and bottom up factors. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 61, 3, 483-495

**2006**

(A8) Lepère C., Boucher D., Jardillier L., Domaizon I., Debroas D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4, 2971-2981.

(A7) Comte J., Jacquet s., Viboud S., Fontvieille d., Paolini G., Domaizon I. (2006) Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, Savoie, February to July 2002). *Microb. Ecol.*, 52, 72-89.

**2005**

(A6) Jacquet S., Domaizon I., Personnic S., Pradeep Ram A.S., Hedal M., *Duhamel S.*, Sime-Ngando T. (2005) Estimates of protozoan- and viral-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshw. Biol.*, 50, 627-645.

**2004**

(A5) Jardillier L., Basset M., Domaizon I., Amblard C., Richardot M., Debroas D. (2004) Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquatic Microbial Ecol.*, 35, 259-273.

**2003**

(A4) 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 (3), 317- 331

**1999-2002**

(A3) Domaizon I., Desvilettes C., Debroas D. & G. Bourdier. 2000 Influence of zooplakton and phytoplankton on the fatty acids composition of digesta and tissue of silver carp : mesocosm experiment. *Journal of Fish Biology*, 57, 417-432.

(A2) Domaizon I., Devaux J. 1999 Impact of silver carp on zooplankton communities. Consequences for the use of silver carp in biomanipulation. *Compte Rendu Académie Sciences, Biologie*, 322, 621-628

<p>(A1) <u>Domaizon I.</u>, Devaux J. 1999 Experimental study of the impacts of silver carp on plankton communities of eutrophic Villerest reservoir (France). <i>Aquatic Ecology</i>, 33, 193-204.</p>
<p><b>ARTICLES EN REVISION DANS REVUES A COMITE DE LECTURE REPERTORIEES DANS ISI WEB OF KNOWLEDGE</b></p>
<p><b>En révision</b></p>
<p>(A16) <u>Mangot J.-F.</u>, Debroas D., <u>Domaizon I.</u> Perkinsozoa, a well-known marine protozoan flagellate parasite group newly identified in lacustrine systems : a review <i>Hydrobiologia</i>.</p>
<p><b>Soumis</b></p>
<p>(A17) <u>Lepère C.</u>, <u>Masquelier S.</u>, <u>Mangot JF.</u>, Debroas D., <u>Domaizon I.</u>, (2009) Vertical distribution of small eukaryote diversity in lakes: a quantitative approach. <i>ISME Journal</i></p>
<p>(A18) Bettarel, Yvan, Bouvier, Thierry, Bouvier, Corinne, Carre, Claire, Desnues, Anne, <u>Domaizon Isabelle</u>, Jacquet, Stéphan, Robin, Agnès, Télesphore, Sime-NGando. Ecological traits of tropical planktonic viruses and prokaryotes along a full salinity gradient. <i>Environmental Microbiology</i></p>
<p><b>ARTICLES DANS REVUES A COMITE DE LECTURE NON REPERTORIEES DANS ISI WEB OF KNOWLEDGE</b></p>
<p><b>2006</b></p>
<p>(B1) Duhamel S., <u>Domaizon I.</u>, <u>Personnic S.</u>, <u>Jacquet S.</u> (2006) Assessing the microbial community dynamics and the role of viruses as bacterial mortality agents in Lake Geneva. <i>J. Water Sci.</i>, 19,115-126.</p>
<p><b>1999</b></p>
<p>(B2) <u>Domaizon I.</u>, Devaux J. <b>1999</b> Nouvelle approche des biomanipulations des réseaux trophiques aquatiques : Introduction d'un poisson phytoplanctonophage, la carpe argentée (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>). <i>L'Année Biologique</i>, 38, 91-106.</p>
<p><b>PUBLICATION DANS ACTES DE COLLOQUE</b></p>
<p><b>2008</b></p>
<p>(ACT2) <u>Domaizon I.</u>, <u>Personnic S.</u>, <u>Lepère C.</u>, <u>Comte J.</u>, <u>Mbade-Sene A.</u>, <u>Dorigo U.</u>, Debroas D., Leberre B., Millery A., Avrillier J.N., Perney P., Jacquet S., 2008 - Les Réseaux trophiques microbiens : structure et facteurs de contrôle. Cas du lac du Bourget. Microbial trophic food webs : structure and regulation. Actes du Colloque 'Autour du lac du Bourget' du 15 au 17 mai 2006. Le Bourget-du-lac : les Editions de La page Blanche. (Université de Savoie) p. 116-124.</p>
<p>(ACT1) <u>Personnic S.</u>, <u>Domaizon I.</u>, Perney P., Jacquet S., 2008 - Dynamique et rôle régulateur des virus aquatiques : Le cas du lac du Bourget . Dynamics and regulating Role of aquatic Viruses: Case of Lake Bourget. Actes du Colloque 'Autour du lac du Bourget' du 15 au 17 mai 2006. Le Bourget-du-lac : les Editions de La page Blanche. (Université de Savoie) p. 140-145.</p>
<p><b>RAPPORTS DE SUIVI DU LAC DU BOURGET</b></p>
<p><b>2004- 2005- 2006- 2007 - 2008</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Partie 'Boucle microbienne' du Rapport Etude lourde lac du Bourget 2004-2005 Coordination JF Humbert</li> <li>- Partie 'Boucle microbienne' des Rapports 'Suivi scientifique du lac du Bourget' 2006 et 2007 Coordination S Jacquet</li> </ul>
<p><b>EDITION ACTES DE COLLOQUE</b></p>
<p><b>2007</b></p>
<p>(Ed1) Jacquet S., Domaizon I., Poulenard J., Arnaud F., (Editeurs) Actes du Colloque 'Autour du lac du Bourget' du 15 au 17 mai 2006, La page Blanche. 275 p.</p>

## COMMUNICATIONS ORALES A CONGRES INTERNATIONAUX

### 2009

(CI11) Berdjeb L., Domaizon I., Parlenti E., Perrette Y., Jacquet S., 2009 - Extending our ecological view of Interactions between bacterivores and bacteriophages in Aquatic freshwater systems. ASLO Aquatic Sciences Meeting, Nice France, January 2009.

### 2008

(CI10) Domaizon I., D. Azam, J.-L. Baglinière, J.-M. Dorioz, L. Lagadic, P. Gaudin & T. Caquet, Research infrastructures for long term experiments and monitoring in freshwater ecosystems facing anthropogenic and natural pressures Workshop ANAEE Paris - September 2008

(CI9) Berdjeb L., Domaizon I., Jacquet S., 2008 - Impact of flagellates on virus role in Lakes Bourget and Annecy. Congress Ecology and Genomics of aquatic viruses, Banyuls-sur-mer, January 2008.

### 2007

(CI8) Domaizon I., Lepère C., Bouvier C., Debroas D., 2007 - Unexpected importance of putative eukaryotic parasites in the picoplankton size fraction of lacustrine systems. Symposium on Aquatic Microbial Ecology SAME 10th. Faro Portugal. September 2007.

### 2006

(CI7) Domaizon I., S. Personnic, U. Dorigo, Berdjeb L., J. Comte, S. Duhamel, Sime Ngando T., A. Sene Mbade, J. Colombet A. Millery, P. Perney, D. Fontvieille, S. Jacquet (2006) Structuring factors and processes of microbial food webs in French alpine lakes. European Large Lakes Symposium Tartu Estonia Sept. 2006 (com. orale)

(CI6) Lepère C., Domaizon I., Debroas D., 2006 - Genetic diversity of freshwater small eukaryotes in the largest French natural lake (Bourget). Congrès CILEF. Tunisie, Avril 2006.

(CI5) Personnic S., Domaizon I., Jacquet S., 2006 - First estimates of viral impact on microbial communities in large French alpine lakes. ASLO summer meeting. Vancouver, Canada, June 2006.

### 2005

(CI4) Personnic S., Domaizon I., Jacquet S., 2005 - Dynamics and interactions of microbial communities in Lake Geneva with an emphasis on viruses 9. Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki, Finlande. 21-26 aout 2005.

### 2004

(CI3) Domaizon I., U. Dorigo, S. Personnic, A. Sene Mbade, J. Comte, A. Millery, S. Jacquet (2004) Assessment of predation impact on freshwater bacterioplankton *In situ* experimental approaches Workshop on Freshwater Microbial ecology, Pallanza Italy Oct 2004

### 2003

(CI2) Debroas D., Basset M., Domaiozn I. (2003) Effets des ressources et de la prédation sur la structure des communautés microbiennes d'un lac eutrophe—Approches moléculaires. CILEF Canada.

### 2002

(CI1) Domaizon I., Viboud S., Fontvieille D. (2002) Taxon specific bacterial grazing rates of flagellates in lake Annecy : Importance of mixotrophy in microbial food webs. SAME 8<sup>th</sup> (Symposium on Aquatic Microbial Ecology) Italy.

## COMMUNICATIONS AFFICHEES A CONGRES INTERNATIONAUX

### 2009

(Af16) Mangot J-F., Lepère C., Bouvier C., Debroas D. & Domaizon I. (2009). A new insight into the lacustrine microbial food web: structure and dynamics of small eukaryotes (< 5 µm) targeted by new oligonucleotide probes. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2009, Nice, 25-30 Janvier 2009.

(Af15) Bettarel Y., Bouvier T., Bouvier C., Carré C., Domaizon I., Jacquet S., Robien A., Sime Ngando T. (2009). Virus-prokaryote interactions along a full salinity gradient. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2009, Nice, 25-30 Janvier 2009.

<b>2006</b>
<b>(Afi4)</b> <i>Lepère C., Domaizon I., Debroas D., 2006 - Genetic diversity of freshwater small eukaryotes in the largest French natural lake (Bourget) European Large Lakes Symposium Tartu (Estonie), 11-15 September 2006.</i>
<b>2005</b>
<b>(Afi3)</b> <i>Personnic S., Domaizon I., Millery A., Jacquet S., 2005 - Dynamics and interactions of the microbial communities in Lake Geneva with a dominant viral axis. 1<sup>st</sup> European Workshop on Aquatic Phage Ecology, Thonon France.</i>
<b>2003</b>
<b>(Afi2)</b> <i>Comte J., Jacquet S., Fontvieille D., Domaizon I. (2003) Etude du réseau trophique microbien dans le lac du Bourget (Savoie, France). Relations entre les communautés bactériennes et leurs prédateurs . CILEF Canada.</i>
<b>2001</b>
<b>(Afi1)</b> <i>Debroas D., Domaizon I., Jardillier L., Basset M. &amp; Amblard C. (2001) Bottom-up and top-down effects on the bacterial community structure. SIL, Australie.</i>
<b>COMMUNICATIONS ORALES A CONGRES NATIONAUX</b>
<b>2009</b>
<b>(CN7)</b> <i>Mangot J-F., Debroas D. &amp; Domaizon I. (2009). Un nouvelle éclairage au sein de la boucle microbienne lacustre: structure et dynamique des petits eucaryotes (&lt; 5 µm) ciblés par de nouvelles sondes oligonucleotidiques. Journée des microbiologistes du pôle clermontois, Clermont-Ferrand, 26 mars 2009. Communication orale.</i>
<b>2007</b>
<b>(CN6)</b> <i>Domaizon I., Debroas D., Lepère C., Bouvier T., BettareL Y., Bouvy M., Fouilland E., LeFloc'h E., Jacquet S., Mangot J.-F., Montagnié H., Mostajir B., Nougier J., Sime-N'Gando T., Torreton J.P., Vidussi F., 2007 - Effet des UV, de la température, des nutriments sur la diversité et structure des eucaryotes unicellulaires Colloque R T A. Montpellier, Novembre 2007.</i>
<b>2005</b>
<b>(CN5)</b> <i>Lepère C., Domaizon I., Debroas D., 2005 - Facteurs de régulation du picoplancton eucaryote. Approche expérimentale en mésocosmes. Congrès GPLF, Orsay France Mai 2005.</i>
<b>(CN4)</b> <i>Lepère C., Domaizon I., Debroas D., 2005 - Structure et facteurs de régulation du picoplancton eucaryote en milieu lacustre. 2<sup>ème</sup> Colloque d'écologie microbienne, Obernai 09-12 Mai 2005.</i>
<b>(CN3)</b> <i>Personnic S., Domaizon I., Jacquet S., 2005 - Dynamique des communautés microbiennes lacustres du Bourget et du Léman : rôle des virus. 2<sup>ème</sup> Colloque d'écologie microbienne, Obernai 09-12 Mai 2005.</i>
<b>2003</b>
<b>(CN2)</b> <i>Debroas D., Domaizon I., Basset M. (2003) Effet des ressources et de la prédation sur la structure des communautés microbiennes. Colloque d'Ecologie Microbienne Marseille</i>
<b>2000</b>
<b>(CN1)</b> <i>Domaizon I., Basset M., Sargos D. &amp; Debroas D. (2000) Effets des ressources et de la prédation sur la structure et le fonctionnement du réseau trophique microbien : approche expérimentale en mésocosmes. CILEF/AFL, France.</i>
<b>COMMUNICATIONS AFFICHEES A CONGRES NATIONAUX</b>
<b>2009</b>
<b>(Afn11)</b> <i>Mangot J-F., Debroas D. &amp; Domaizon I. (2009). Etude de la structure et de la dynamique des petits eucaryotes lacustres (&lt; 5 µm) par la mise en application de nouvelles sondes oligonucléotidiques. AFEM Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Lyon, 31 Août-02 Septembre 2009.</i>
<b>2008</b>

(AfN10) Mangot J-F ; Debroas D., Domaiozn I. (2008). Importance des parasites eucaryotes dans les systèmes planctoniques lacustres. Séminaire des doctorants INRA du département EPFA, Dinard, 6-8 Octobre 2008. Poster.

2007

(AfN9) Berdjeb L., Domaizon I., Perrette Y., Perney P., Jacquet S., 2007 - Effet des virus et des protistes flagellés sur la dynamique des ressources nutritives et la qualité de la matière organique en milieu lacustre. Colloque d'Écologie Microbienne organisé par l'Association Française d'Écologie Microbienne (AFEM). La grande Motte, France, Octobre 2007

(AfN8) Bettarel Y., Bouvier T., Bouvy M., Carré C., Corbin D., Desnues A., Domaizon I., Jacquet S., Mboup M., Ndour E.H., Ngom R., Rayé A., Robin A., Sime-Ngando T., 2007 - Le virioplancton le long d'un gradient de salinité. Colloque Ecologie Microbienne, organisé par l'Association Française d'Écologie Microbienne (AFEM) La Grande Motte France Octobre 2007.

(AfN7) Domaizon I., Lepère C., Debroas D., 2007 - Importance des eucaryotes potentiellement parasites en milieu lacustre. Colloque d'Ecologie Microbienne (AFEM). La Grande Motte, France, Octobre 2007.

(AfN6) Lepère C., Domaiozn I., Debroas D., 2007 - Etude de la diversité génétique des eucaryotes unicellulaires (0.2-5µm) lacustres : approches biogéographique. Colloque d'Ecologie Microbienne (AFEM), La Grande Motte France, Octobre 2007.

2006

(AfN5) Lepère C., Domaizon I., Debroas D., Diversité génétique des eucaryotes unicellulaires (0.2-5µm) dans le lac du Bourget. 1<sup>ER</sup> colloque national : Autour du lac du Bourget ; Le Bourget du lac, Mai 2006.

(AfN4) Personnic S., Domaizon I., Jacquet S., 2006 - Dynamique et rôle régulateur des virus aquatiques : la cas du Bourget. 1<sup>ER</sup> colloque national : Autour du lac du Bourget ; Le Bourget du lac, Mai 2006.

(AfN3) Personnic S., Domaizon I., Pernay P., Jacquet S., 2006 - Impacts de la lyse virale et de la prédation sur les communautés bactériennes du lac du Bourget. 1<sup>ER</sup> colloque national : Autour du lac du Bourget ; Le Bourget du lac, Mai 2006.

(AfN2) Bouvier T., Bettarel Y., Bouvier C., Bouvy M., Domaizon I., Fouilland E., Le Floc'h E., Jacquet S., Montanié H., Mostajir B., Nougier J., Sime-Ngando T., Torreton J.-P., Trousselier M., Vidussi t F., 2006 - Effet des virus sur la diversité bactérienne : comparaison avec d'autres facteurs structurants. Colloque « Développement récent de la Recherche en environnement côtier », Nantes, France, juin 2006.

2000

(AfN1) Jardillier L., Basset M., Domaizon I., Debroas D & Amblard C. (2000) Effets de la prédation des protistes phagotrophes et des cladocères sur la dynamique de différents groupes bactériens en milieu lacustre. CILEF/AFL, France.

COMMUNICATIONS HORS CONGRES ET COLLOQUES

2007

(COM2) Berdjeb L., Domaizon I., Perrette Y., Jacquet S., 2007 - Résultats préliminaires de l'impact de la lyse virale et de la prédation par les flagellés hétérotrophes sur la structure de la matière organique appréhendée par la spectroscopie de fluorescence 3D Ecole-Chercheur sur la caractérisation de la matière organique. La Rochelle, France.

2005

(COM1) Sime-Ngando T., Jacquet S., Domaizon I., 2005 - VIRULAC: Dynamique et rôle des virus dans le fonctionnement des réseaux trophiques lacustres. Journées 2005 du programme ECCO, Toulouse, France, décembre 2005. (poster).

COMMUNICATIONS DES DOCTORANTS A SEMINAIRES

2009

*Mangot J-F.*, Debroas D., Domaizon I. (2009). Dynamics and diversity of unicellular eukaryotes parasites in planktonic lacustrine systems. Journée des doctorants de l'UMR CARTEL, Thonon-les-bains, 15 janvier 2009. Communication orale.

**2008**

*Mangot J-F, Debroas D., Domaizon I.* (2008). Les parasites eucaryotes dans les systèmes planctoniques lacustres: Dynamique et Diversité. Journée de l'école doctorale SISEO, Chambéry, 4 Novembre 2008. Poster

*Berdjeb L., Domaizon I., Jacquet S.,* 2008 - Évolution de l'interaction écologique microbienne au sein des écosystèmes lacustres mésotrophes vs. oligotrophes. Séminaire des doctorants EFPA, Dinard, octobre 2008. Communication orale.

*Mangot J-F. Debroas D., Domaizon I.* (2008). Importance des parasites eucaryotes dans les systèmes planctoniques lacustres. Séminaire des doctorants INRA du département EPFA, Dinard, 6-8 Octobre 2008. Poster

**Thèses co-encadrées**

**2007**

**(Th2) Personnic S.,** 2007 - Dynamique des communautés microbiennes et impacts des virus sur les bactéries auto et hétérotrophes en milieu lacustre. Thèse Université de Savoie, 358 p.

**(Th1) Lepère C.,** 2007 - Diversité, dynamique et facteur de régulation des picoeucaryotes dans les écosystèmes lacustres. Thèse Université de Savoie, 239 p.

**Stages diplômants encadrés**

**2009**

**(S5) Villar C.,** 2009 L'ADN fossile : paléo-indicateur des communautés planctoniques passées - Licence professionnelle protection de l'environnement intitulée « Traitement des Eaux et Dépollution des Sols » Université de Savoie, UMR CARTELE Le Bourget du lac. 40 p.

**2007**

**(S4) Bouvier C.,** 2007 - Etude d'un groupe eucaryote parasite (Perkinsozoa) en milieu lacustre. Validation et mise en application d'outils moléculaires. Rapport de Master 2 Recherche, Biodiversité et Fonctionnement des Ecosystèmes. Université de Savoie, UMR CARTELE Le Bourget du lac. 32 p.

**2006**

**(S3) Berdjeb L.,** 2006 - Effet des virus et des protistes flagellés sur les ressources nutritives et sur la dynamique et la structure de la communauté bactérienne lacustre. Mémoire de Master 2 d'Océanographie et Environnement marin. Parcours n°6 : Océanographie pélagique. Université Pierre et Marie Curie Paris VI. Thonon-les-Bains : INRA, Station d'Hydrobiologie Lacustre, 65 p.

**2003**

**(S2) Mbade Sene A. ,** 2003 Impact de la prédation planctonique sur les communautés microbiennes lacustres - Mémoire de DEA Gestion des espaces montagnars Université J Fourier Grenoble

**2002**

**(S1) Comte J. \_** 2002 - Etude préliminaire du réseau trophique microbien sur le lac du Bourget - Mémoire de DEA Gestion des espaces montagnars Université J Fourier Grenoble



## Références bibliographiques



## A

- Agawin, N. S. R., C. M. Duarte, S. Agustí (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnol. Oceanogr.* 45: 591-600.
- Agogue H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ (2008) Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature* 456:788-791
- Amaral-Zettler, L. A., E. A. McCliment, et al. (2009) A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes." *PLoS ONE* 4(7): e6372.
- Amblard, C., J. F. Carrias, et al. (1995). The Microbial Loop in a Humic Lake - Seasonal and Vertical Variations in the Structure of the Different Communities. *Hydrobiologia* 300: 71-84.
- Amato A. W.H.C.F. Kooistra, J. H. L. Ghiron, D. G. Mann, T. Proscholdc, M. Montresor (2007) Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms Protist, 158: 193-207
- Amato A. & M. Montresor (2008) Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia* 47 (5): 487-497
- Amundsen, P. A., K. D. Lafferty, et al. (2009) Food web topology and parasites in the pelagic zone of a subarctic lake. *Journal of Animal Ecology* 78(3): 563-572.
- Anneville, O., V. Ginot, et al. (2002) Long-term study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva: a multi-table approach. *Journal of Plankton Research* 24(10): 993-1007.
- Anneville, O., S. Gammeter, et al. (2005) Phosphorus decrease and climate variability: mediators of synchrony in phytoplankton changes among European peri-alpine lakes. *Freshwater Biology* 50(10): 1731-1746.
- Arditi, R., L. R. Ginzburg, et al. (1991) Variation in Plankton Densities among Lakes - a Case for Ratio-Dependent Predation Models. *American Naturalist* 138(5): 1287-1296.
- Arias-González, J.E. & S. Morand (2006) Trophic functioning with parasites: a new insight for ecosystem analysis. *Marine Ecology Progress Series* 320: 43-53.
- Arnaud, F., M. Revel, et al. (2005) 7200 years of Rhone river flooding activity in Lake Le Bourget, France: a high-resolution sediment record of NW Alps hydrology. *Holocene* 15(3): 420-428.
- Auer, B., U. Elzer, et al. (2004) Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation. *J. Plankton Res.* 26(6): 697-709.
- Auguet JC, Barberan A, Casamayor EO (2009) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal*
- Auguet JC. & Casamayor E.O. (2008) A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environ Microbiol* 10:1080-1086
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology-Progress Series* 10: 257-263

## B

- Barroin, G. (1990) Water Polluted by Phosphates. *Recherche* 21(221): 620-627.
- Barroin, G. (1991) Restoration of Lakes. *Recherche* 22(238): 1412-1422.

- Behnke, A., J. Bunge, K. Barger, H. W. Breiner, V. Alla, & T. Stoeck (2006) Microeukaryotes community patterns along an O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>S gradient in a supersulfidic anoxic fjord (Framwaren, Norway). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3626-3636.
- Bell W.H. & J.M. Lang (1974) Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular product? *Limnol. Oceanogr.* 19: 833-839.
- Bennett, S. J., R. W. Sanders, & K. G. Porter (1990) Heterotrophic, autotrophic and mixotrophic nanoflagellates: seasonal abundances and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 35: 1821-1832.
- Bergh, O., K. Y. Borsheim, et al. (1989) High Abundance of Viruses Found in Aquatic Environments. *Nature* 340(6233): 467-468.
- Bettarel, Y., T. Sime-Ngando, et al. (2005) Low consumption of virus-sized particles by heterotrophic nanoflagellates in two lakes of the French Massif Central. *Aquatic Microbial Ecology* 39(2): 205-209.
- Biddanda, B. A. & L. R. Pomeroy (1988) Microbial Aggregation and Degradation of Phytoplankton-Derived Detritus in Seawater .1. Microbial Succession. *Marine Ecology Progress Series* 42(1): 79-88.
- Bouvier, T., Becquevort, S., & C. Lancelot (1998) Biomass and feeding activity of phagotrophic mixotrophs in the north-western Black Sea during the summer 1995. *Hydrobiologia* 363: 289-301.
- Bouvy, M., M. Pagano, et al. (2006) Functional structure of microbial food web in the Senegal River Estuary (West Africa): impact of metazooplankton. *Journal of Plankton Research* 28(2): 195-207.
- Bournet PE, D. Dartus, B. Tassin, B Vincon-Leite (1996) Ondes internes du lac du Bourget : analyses des observations par des modèles linéaires. *Rev. Sci. Eau* 2, 247-266
- Bratbak, G., M. Levasseur, et al. (1995) Viral activity in relation to *Emiliana huxleyi* blooms: A mechanism of DMSP release? *Marine Ecology-Progress Series* 128(1-3): 133-142.
- Breed, G. A., G. A. Jackson, et al. (2004) Sedimentation, carbon export and food web structure in the Mississippi River plume described by inverse analysis. *Marine Ecology-Progress Series* 278: 35-51.
- Brett, M. T., M. J. Kainz, et al. (2009) Phytoplankton, not allochthonous carbon, sustains herbivorous zooplankton production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(50): 21197-21201.
- Bronmark, C., S. P. Klosiewski, et al. (1992) Indirect Effects of Predation in a Fresh-Water, Benthic Food-Chain. *Ecology* 73(5): 1662-1674.
- Brugerolle, G. (2002) *Cryptophagus subtilis*: a new parasite of cryptophytes affiliated with the Perkinsozoa lineage. *Europ. J. Protist.* 37: 379-390.
- Burreson, E.M., R.S. Alvarez, V. Vidal, M. Leopoldina & A. Macedo (1994) *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Disease of Aquatic Organisms* 20: 73-82
- Bushek, D., C.F. Dungan & A.J. Lewitus (2002) Serological Affinities of the Oyster Pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) with Some Dinoflagellates (Dinophyceae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 11-16.
- Bruckner, C. G., R. Bahulikar, et al. (2008) Bacteria Associated with Benthic Diatoms from Lake Constance: Phylogeny and Influences on Diatom Growth and Secretion of Extracellular Polymeric Substances. *Applied and Environmental Microbiology* 74(24): 7740-7749.

Byers, J. E. (2009) Including parasites in food webs. *Trends in Parasitology* 25(2): 55-57.

## C

Canter, H.M. & J.W.G. Lund (1969) The parasitism of planktonic desmids by Fungi. *Plant Systematics and Evolution*. 116: 351-377.

Carlson, C. A. & H. W. Ducklow (1995) Dissolved Organic-Carbon in the Upper Ocean of the Central Equatorial Pacific-Ocean, 1992 - Daily and Finescale Vertical Variations. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 42(2-3): 639-656.

Carpenter, S.R., & J.F. Kitchell (eds.) (1993) *The Trophic Cascade in Lakes*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England. 385 p.

Carpenter, S. R. & J. F. Kitchell (1992) Trophic Cascade and Biomanipulation - Interface of Research and Management - Reply. *Limnol. Oceanogr.* 37(1): 208-213.

Carpenter, S. R., J. F. Kitchell, et al. (1996) Chlorophyll variability, nutrient input, and grazing: Evidence from whole-lake experiments. *Ecology* 77(3): 725-735.

Carpenter, S. R. (2008) Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *PNAS* 105(32): 11039-11040.

Carpenter, S. R., W. A. Brock, et al. (2008) Leading indicators of trophic cascades. *Ecology Letters* 11(2): 128-138.

Caron, D. A. (1994) Inorganic Nutrients, Bacteria, and the Microbial Loop. *Microbial Ecol.* 28(2): 295-298.

Caron D. A., R. J. Gast, E. L. Lim, & M. R. Dennet (1999) Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions. *Hydrobiologia* 401: 215-227.

Caron, D. A. (2009) Past President's Address: Protistan Biogeography: Why All The Fuss? *J. Euk. Microbiol.* 56(2): 105-112.

Carrias, J. F., C. Amblard, C. Quiblier-Lloberas, & G. Bourdier (1998) Seasonal dynamics of free and attached heterotrophic nanoflagellates in an oligomesotrophic lake. *Freshwater Biol.* 39: 91-101.

Carrias, J. F., C. Amblard, et al. (1996) Protistan bacterivory in an oligomesotrophic lake: Importance of attached ciliates and flagellates. *Microbial Ecology* 31(3): 249-268.

Casas, S.M., K.S. Reece, Y. Li, J.A. Moss, A. Villalba & J.F. La Peyre (2008) Continuous Culture of *Perkinsus mediterraneus*, a Parasite of the European Flat Oyster *Ostrea edulis*, and Characterization of Its Morphology, Propagation, and Extracellular Proteins in Vitro. *J. Euk. Microbiol.* 55: 34-43

Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiological Reviews*. 57: 953-994.

Cavalier-Smith, T. & E.Y. Chao (2003) Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist*. 154: 341-358.

Chambouvet, A., P. Morin, D. Marie & L. Guillou. (2008) Control of toxic marine dinoflagellate blooms by serial parasitic killers. *Science* 322: 1254-1257.

Chen, F., K. Wang, et al. (2006) Diverse and Unique Picocyanobacteria in Chesapeake Bay, Revealed by 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3): 2239-2243.

Cleven, A. J., Weisse, T. (2001) Seasonal succession and taxon specific bacterial grazing rates of heterotrophic nanoflagellates in Lake Constance. *Aquat. Microb. Ecol.* 23: 147–161.

Coss, C.A., J.A.F. Robledo & G.R. Vasta (2001) Fine structure of clonally propagated in vitro life stages of a *Perkinsus* sp. isolated from the Baltic Clam *Macoma balthica*. *J. Euk. Microbiol.* 48: 38-51.

## D

Del Giorgio P. A., Gasol J. M., Vaquer D., Mura P., Agusti S., C. M. Duarte (1996) Bacterioplankton community structure : Protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. Waco, TX, ETATS-UNIS, American Society of Limnology and Oceanography.

Demelo, R., R. France, et al. (1992) Biomanipulation - Hit or Myth. *Limnol. Oceanogr.* 37(1): 192-207.

Dorigo U., Fontvieille D., J.-F. Humbert (2006) Spatial variability in the abundance and composition of the free living bacterioplankton community in the pelagic zone of Lake Bourget (France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 58 :109-119

Dubois, J. P., C. Gillet, et al. (2008) The impact of trophic changes over 45 years on the Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, population of Lake Geneva. *Aquatic Living Resources* 21(4): 401-410.

## E

Elandaloussi, L.M., N. Carrasco, A. Roque, K. Andree, M.D. Furones (2009) First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 50-53.

## F

Fenchel, T. & Finlay, B.J. (2004) Here and there or everywhere? Response from Fenchel and Finlay. *BioScience* 54 : 884-885.

Fenchel, T. (2008). The microbial loop - 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Marine ecology: A tribute to the life and work of John S. Gray* 366(1-2): 99-103.

Fernández-Robledo, J.A., E.J. Schott & G.R. Vasta (2008) *Perkinsus marinus* superoxide dismutase 2 (PmSOD2) localizes to single-membrane subcellular compartments. *Biochemical and Biophysical Res. Com.* 375: 215-219.

Figueroa, R.I., E. Garcés, R. Massana & J. Camp (2008) Description, host-specificity, and strain selectivity of the dinoflagellate parasite *Parvilucifera sinerae* sp. nov. (Perkinsozoa). *Protist* 159: 563-578.

Finlay, B.J. & T.Fenchel, (2004) Cosmopolitan metapopulations of free-living microbial eukaryotes. *Protist* 155 : 237-244.

Foissner, W. (2006) Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozool.* 45:111– 136.

Fuhrman, J. A. & M. Schwalbach (2003) Viral Influence on Aquatic Bacterial Communities. *Biol Bull* 204(2): 192-195.

Fuhrman J.A. & Noble R.T (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater *Limnol. Oceanogr.*, 40(7): 1236-1242

Fukami, K., T. Nishijima, et al. (1997) Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae. *Hydrobiologia* 358: 185-191.

Fuller, N. J., C. Campbell, et al. (2006) Analysis of photosynthetic picoeukaryote diversity at open ocean sites in the Arabian Sea using a PCR biased towards marine algal plastids. *Aquatic Microbial Ecol.* 43(1): 79-93.

## G

Gasol, J. M. & D. Vaque (1993) Lack of Coupling between Heterotrophic Nanoflagellates and Bacteria - a General Phenomenon across Aquatic Systems. *Limnol. Oceanogr.* 38(3): 657-665.

Gasol, J. M. (1994) A Framework for the Assessment of Top-Down Vs Bottom-up Control of Heterotrophic Nanoflagellate Abundance. *Mar. Ecol. Prog. Series* 113(3): 291-300.

Ghiglione, J. F., P. Conan, et al. (2009). Diversity of total and active free-living vs. particle-attached bacteria in the euphotic zone of the NW Mediterranean Sea. *Fems Microbiology Letters* 299(1): 9-21.

Giguët-Covex, C., F. Arnaud, et al. Sedimentological and geochemical records of past trophic state and hypolimnetic anoxia in large, hard-water Lake Bourget, French Alps. *Journal of Paleolimnology* 43(1): 171-190.

Gillet, C. & J. P. Dubois (2007) Effect of water temperature and size of females on the timing of spawning of perch *Perca fluviatilis* L. in Lake Geneva from 1984 to 2003. *J. Fish Biol.* 70(4): 1001-1014.

Giovannoni, S. J., E. F. Delong, G. J. Olsen, and N. R. Pace (1988) Phylogenetic group specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170: 2418.

Gisselson, L. A., Carlsson, P. Granéli, E. & J. Pallon (2002) Dinophysis blooms in the deep euphotic zone of the Baltic Sea: do they grow in the dark? *Harmful Algae.* 1:401-418.

Goldstein, S. (1960) Physiology of aquatic Fungi: Nutrition of two monocentric chytrids. *J. bacteriol.* 80: 701-707.

Gossart HP (1999) Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab *Aquat. Microb. Ecol.* 19: 1-11.

Guillou, L., S. Y. Moon-Van Der Staay, H. Claustre, F. Partensky, & D. Vaultot (1999) Diversity and Abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in Two Oceanic Regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4528-4536.

Guillou, L., W. Eikrem, et al. (2004) Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* 155(2): 193-214.

Guillou, L., M. Viprey, A. Chambouvet, R.M. Welsh, A.R. Kirkham, R. Massana, D.J. Scanlan & A.Z. Worden (2008) Occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). *Env. Microbiol.* 10: 3349-3365.

Gullian-Klanian, M., J.A. Herrera-Silveira, R. Rodriguez-Canul & L. Aguirre-Macedo (2008) Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 237-247.

Gurung, T. B., M. Kagami, et al. (2001) Relative importance of biotic and abiotic factors affecting bacterial abundance in Lake Biwa: an empirical analysis. *Limnology* 2(1): 19-28.

Grami B., Niquil N., Sakka Hlaili A., Gosselin M., Hamel D., Hadj Mabrouk H., 2008. The plankton food web of the Bizerte Lagoon (South-Western Mediterranean) : II. Carbon steady-state modelling using inverse analysis. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 79 : 101-113

Groisillier, A., R. Massana, K. Valentin, D. Vaultot & L. Guillou (2006) Genetic diversity and habitats of two enigmatic marine alveolate lineages. *Aquatic Microbial Ecol.* 42: 277-291.

Grossart Hans-Peter; Jezbera Jan; Hornák Karel; Hutalle Kristine Michelle L; Buck Ulrike; Simek Karel (2008) Top-down and bottom-up induced shifts in bacterial abundance, production and community composition in an experimentally divided humic lake. *Env. Microbiol.* 10(3):635-52.

## H

Hakimi, M.A. & K.W. Deitsch (2007) Epigenetics in Apicomplexa: control of gene expression during cell cycle progression, differentiation and antigenic variation. *Current Opinion in Microbiol.* 10: 357-362.

Hasegawa Y, Martin, J. L., Giewat MW, J. Rooney-Varga (2007) Microbial community diversity in the phycosphere of natural populations of the toxic alga, *Alexandrium fundyense*. *Environ. Microbiol.* 9: 3108-3121.

Havskum, H., & B. Riemann (1996) Ecological importance of bacterivorous pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137: 251–263.

Hebsgaard, M.B., Phillips, M.J., & E. Willerslev (2005) Geologically ancient DNA: Fact or artefact? *Trends in Microbiology*, v. 13, p. 212–220, doi: 10.1016/j.tim.2005.03.010

Hornung, M. & B. Reynolds (1995) The effects of natural and anthropogenic environmental changes on ecosystem processes at the catchment scale. *Trends in Evolution and Ecology* 10 : 443–449.

Hulot, F. D., G. Lacroix, et al. (2000) Functional diversity governs ecosystem response to nutrient enrichment. *Nature* 405(6784): 340-344.

## I

Ibelings B., W. Arnout De Bruin, M. Kagami, M. Rijkeboer, M. Brehm, & E. Van Donk (2004) Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi (chytridiomycota). *J. Phycol.* 40: 437-453.

## J

Jardillier, L., D. Boucher, et al. (2005) Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: Microcosm experiments. *Fems Microbiology Ecology* 53(3): 429-443.

Jardillier, L., Y. Bettarel, et al. (2005) Effects of viruses and predators on prokaryotic community composition. *Microbial Ecol.* 50(4): 557-569.

Jones, R. I. (2000) Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biol.* 45(2): 219-226.

Jurgens, K., H. & Arndt, et al. (1994) Zooplankton-Mediated Changes of Bacterial Community Structure. *Microbial Ecol.* 27(1): 27-42.

Jurgens, K. & H. Gude (1994) The Potential Importance of Grazing-Resistant Bacteria in Planktonic Systems. *Marine Ecol. Prog. Series* 112(1-2): 169-188.

Jurgens, K., H. Arndt, et al. (1997) Impact of metazoan and protozoan grazers on bacterial biomass distribution in microcosm experiments. *Aquatic Microbial Ecol.* 12(2): 131-138.

## K

Kagami, M., E. Van Donk, A. De Bruin, M. Rijkeboer & B.W. Ibelings (2004) Daphnia can protect diatoms from fungal parasitism. *The American Society of Limnology and Oceanography.* 49: 680-685.

Kalinowska, K. (2004). "Bacteria, nanoflagellates and ciliates as components of the microbial loop in three lakes of different trophic status." *Polish Journal of Ecology* 52(1): 19-34.

Katechakis, A. & H. Stibor (2006) The mixotroph *Ochromonas tuberculata* may invade and suppress specialist phago- and phototroph plankton communities depending on nutrient conditions. *Oecologia*. 148: 692-701.

Katano, T., M. Fukui, et al. (2001) Identification of cultured and uncultured picocyanobacteria from a mesotrophic freshwater lake based on the partial sequences of 16S rDNA. *Limnology* 2(3): 213-218.

Keeling, P. J., G. Burger, D. G. Durnford, B. F. Franz Lang, R. W. Lee, R. E. Pearlman, A. J. Roger, and M. W. Gray (2005) The tree of Eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 20.

Kühn, S., L. Medlin, et al. (2004) Phylogenetic Position of the Parasitoid Nanoflagellate *Pirsonia* inferred from Nuclear-Encoded Small Subunit Ribosomal DNA and a Description of *Pseudopirsonia* n. gen. and *Pseudopirsonia mucosa* (Drebes) comb. nov. *Protist* 155(2): 143-156.

## L

Lafferty, K. D., A. P. Dobson, et al. (2006) Parasites dominate food web links. *PNAS* 103(30): 11211-11216.

Lammens, E. H. R. R. (2001) Consequences of biomanipulation for fish and fisheries. *FAO Fisheries Circular*(952).

Lara, E., D. Moreira, et al. The Environmental Clade LKM11 and *Rozella* Form the Deepest Branching Clade of Fungi. *Protist* 161(1): 116-121.

Laybourn-Parry, J. & M. Walton (1998) Seasonal heterotrophic flagellate and bacterial plankton dynamics in a large oligotrophic lake - Loch Ness, Scotland. *Freshwater Biol.* 39(1): 1-8.

Lazzaro X. & G. Lacroix (1995) Impact des poissons sur les communautés aquatiques. In : Pourriot R. & M. Meybeck (Eds), *Limnologie Générale*, Masson Paris : 648-686.

Lazzaro X, G Lacroix , B Gauzens , J Gignoux and S Legendre (2009) Predator foraging behaviour drives food-web topological structure. *Journal of Animal Ecology* 78 (6) :1307–1317

Latour D., H. Giraudet et J-L. Berthon (2004) Frequency of dividing cells and viability of *Microcystis aeruginosa* in sediment of a eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecol.* 36 : 117-122

Leander, B.S. & P.J. Keeling (2003) Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 395-402.

Leander, B.S. & M. Hoppenrath. 2008. Ultrastructure of a novel tube-forming, intracellular parasite of dinoflagellates: *Parvilucifera prorocentri* sp. nov. (Alveolata, Myzozoa). *European Journal of Protistology*. 44: 55-70.

Lefèvre, E., C. Bardot, C. Noël, J.F. Carrias, E. Viscogliosi, C. Amblard & T. Simé-Ngando. 2007. Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environmental Microbiology*. 9: 61-71.

Lefèvre, E., B. Roussel, C. Amblard, & T. Simé-Ngando (2008) The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes reveals high occurrence of putative parasitoids in the plankton. *PLoS ONE*. 3: 2324-2333.

Lefranc, M., Thénot A., Lepère C. & D. Debroyas (2005) Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied in Environmental Microbiology*. 71: 5935-5942.

Legendre, L. & F. Rassoulzadegan (1995) Plankton and Nutrient Dynamics in Marine Waters. *Ophelia* 41: 153-172.

Legrand C, Johansson N, Johnsen G, Borsheim KY, & Granéli E. (2001) Phagotrophy and toxicity variation in the mixotrophic *Prymnesium patelliferum* (Haptophyceae). *Limnol Oceanogr* 46:1208–1214.

Leguerrier, D., N. Niquil, et al. (2003) Numerical analysis of the food web of an intertidal mudflat ecosystem on the Atlantic coast of France. *Marine Ecology-Progress Series* 246: 17-37.

Leguerrier, D., N. Niquil, et al. (2004) Modeling the impact of oyster culture on a mudflat food web in Marennes-Oleron Bay (France). *Marine Ecology-Progress Series* 273: 147-161.

Lennon, J. T. & K. L. Cottingham (2008) Microbial productivity in variable resource environments. *Ecology* 89(4): 1001-1014.

Lester, R.J.G., C.L. Goggin & K.B. Sewell (1990) *Perkinsus* in Australia. In: Cheng, T. C. & Perkins, F. O. (ed.), *Pathology in Marine Aquaculture*. Academic Press, New York. p. 189-199.

Li, W. K. W., D. V. Subba Rao, W. G. Harrison, J. C. Smith, J. J. Cullen, B. Irwin & T. Platt (1983) Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science*. 219: 292-295.

Li, W. K. W. (1995) Composition of ultraphytoplankton in the central North Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 1-8.

López-García, P., F. Rodríguez-Valera, C. Pedrós-Alió, & D. Moreira (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*. 409: 603-607

Lopez-Garcia, P. & D. Moreira (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology* 159(1): 67-73.

## **M**

Mackin, J.G., H.M. Owen & A. Collier (1950) Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*. 111: 328-329.

Mackin, J.G. (1951) Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* Gmelin by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*. 1: 72-87.

Martin-Cuadrado AB, Rodriguez-Valera F, Moreira D, Alba JC, Ivars-Martinez E, Henn MR, Talla E, Lopez-Garcia P (2008) Hindsight in the relative abundance, metabolic potential and genome dynamics of uncultivated marine archaea from comparative metagenomic analyses of bathypelagic plankton of different oceanic regions. *ISME J* 2:865-886

Massana, R., L. Guillou, B. Diez, and C. Pedros-alio (2002) Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4554-4558.

Massana, R, V. Balagué, L. Guillou, & C. Pedros-Alio (2004) Picoeukaryotic diversity in a oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiol.Ecol.* 50: 231-243.

Massana, R. & C. Pedros-Alio (2008). Unveiling new microbial eukaryotes in the surface ocean. *Current Opinion in Microbiology* 11(3): 213-218.

Massana, R., B. Karniol, et al. (2008) Metagenomic retrieval of a ribosomal DNA repeat array from an uncultured marine alveolate. *Environmental Microbiology* 10(5): 1335-1343.

Mazumder, A., D. J. McQueen, et al. (1990) Pelagic Food Web Interactions and Hypolimnetic Oxygen Depletion - Results from Experimental Enclosures and Lakes. *Aquatic Sciences* 52(2): 144-155.



- Mazumder, A. (1994). Patterns of Algal Biomass in Dominant Odd-Link Vs Even-Link Lake Ecosystems. *Ecology* 75(4): 1141-1149.
- McQueen D.J., Post J.R. & Mills E.L. (1986) Trophic relationships in freshwater pelagic ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1571-1581.
- Medlin, L. K., K. Metfies, H. Mehl, K. Wiltshire, & K. Valentin (2006) Picoeukaryotic plankton diversity at the helgoland time series site as assessed by three molecular methods. *Mirob. Ecol.* 52: 53-71.
- Metzler, M.P., M.P. Gilbert, S.G. Gaeta & J.M. Ludlam (2000) Contrasting effects of substrate and grazer manipulations on picoplankton in oceanic and coastal waters of Brazil. *J. Plankton. Res.* 22:77-90.
- Middelboe, M., Riemann, L., Steward, G.F., Hansen, V. & Nybroe, O. (2003) Virus-induced transfer of organic carbon between marine bacteria in a model community. *Aquat. Microb. Ecol.* 33:1-10.
- Moliner, J. C., O. Anneville, et al. (2006) Anthropogenic and climate forcing on the long-term changes of planktonic rotifers in Lake Geneva, Europe. *Journal of Plankton Research* 28(3): 287-296.
- Monger, B. C. & M. R. Landry (1991) Prey-Size Dependency of Grazing by Free-Living Marine Flagellates. *Marine Ecology-Progress Series* 74(2-3): 239-248.
- Monger, B. C., M. R. Landry, et al. (1999) Feeding selection of heterotrophic marine nanoflagellates based on the surface hydrophobicity of their picoplankton prey. *Limnology and Oceanography* 44(8): 1917-1927.
- Moon-van der Staay, S. Y., R. De Wachter, & D. Vaultot (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature* 409: 607-610.
- Morand S. & E.A. Gonzalez (1997) Is parasitism a missing ingredient in model ecosystems?, *Ecol. Modell.* 95: 61-74.
- Moreira, D. & P. López-García (2002) The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends in Microbiology.* 10: 31-38.
- Mou, X., S. Sun, R. A. Edwards, R. E. Hodson & M. A. Moran (2008) Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature* 451: 708-711.
- Muylaert, K., L. Zhao, et al. (2006) Trophic coupling in the microbial food web of a eutrophic shallow lake (Lake Visvijver, Belgium). *Archiv Fur Hydrobiologie* 166(3): 307-324.
- N**
- Nakano, S., N. Ishii, P. M. Manage & Z. Kawabata (1998) Trophic roles of heterotrophic nanoflagellates and ciliates among planktonic organisms in a hypereutrophic pond. *Aquat. Microb. Ecol.* 16: 153-161
- Nakano S., p. M. Manage, Y. Nishibe & Z. Kawabata (2001) Trophic linkage among heterotrophic nanoflagellates, ciliates and metazoan zooplankton in a hypereutrophic pond. *Aquat. Microb. Ecol.* 25: 259-270
- Naviner, M., J. P. Berge, et al. (1999) Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174(1-2): 15-24.
- Ngo, T.T.T. & K.S. Choi (2004) Seasonal changes of Perkinsus and Cercaria infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture.* 239 : 57-68.

- Niquil, N., G. A. Jackson, et al. (1998) Inverse model analysis of the planktonic food web of Takapoto Atoll (French Polynesia). *Marine Ecology-Progress Series* 165: 17-29.
- Niquil N., Bartoli G., Urabe J., Jackson G.A., Legendre L., Dupuy C., & K. Kumagai (2006) Carbon steady-state model of the planktonic food web of Lake Biwa, Japan. *Freshwater Biology* 51(8) : 1570-1585
- Norén, F., O. Moestrup & A.S. Rehnstam-Holm. 1999. *Parvilucifera infectans* Norén et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology*. 35: 233-254.
- Not, F., R. Massana, M. Latasa, D. Marie, C. Colson, W. Eikrem, C. Pedros-Alio, D.Vaulot & N. Simon (2005) Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnol. Oceanogr.* 50: 1677-1686.
- Not, F., Latasa, M., Scharek, R., Viprey, M., Karleskind, P., Balagué, V., Ontoria, I., Cumino, A., Goetze, E., Vaulot, D. & Massana, R (2008) Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep - Sea Research Part I - Oceanographic Research Papers* 55:1456-1473
- O**
- Oksanen L., Fretwell S.D., Arruda J. & P. Niemela (1981) Exploitation ecosystems in gradients of primary productivity. *Am. Nat.* 118: 240-261.
- P**
- Pace, M. L. and J. J. Cole (1994a) Comparative and Experimental Approaches to Top-Down and Bottom-up Regulation of Bacteria. *Microbial Ecology* 28(2): 181-193.
- Pace, M. L. & J. J. Cole (1994b) Primary and Bacterial Production in Lakes - Are They Coupled over Depth. *Journal of Plankton Research* 16(6): 661-672.
- Pace, M. L., J. J. Cole, S. R. Carpenter & J. F. Kitchell (1999) Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution* 14:483-488.
- Paine R.T. (1980) Food webs: linkage, interaction strength, and community infrastructure. *J. Anim. Ecol.* 49 : 667-685.
- Palenik B. & 37 co authors (2007) The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proc. National Academy of Sciences*. 104: 7705-7710.
- Park, M.G., S.K. Cooney, W. Yih & D.W. Coats (2002) Effects of two strains of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya* on growth, photosynthesis, light absorption, and quantum yield of bloom-forming dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*. 227: 281-292.
- Park, M. G., W. Yih & D. W. Coats (2004) Parasites and phytoplankton, with special emphasis on dinoflagellate infections. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51: 145-155.
- Park, K.I., T.T.T. Ngo, S.D. Choi, M. Cho & K.S. Choi (2006) Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *Journal of Invertebrate Pathology*. 93: 81-87.
- Perga, M. E., A. Bec, & O. Anneville (2009) Origins of carbon sustaining the growth of whitefish *Coregonus lavaretus* early larval stages in Lake Annecy: insights from fatty-acid biomarkers. *Journal of Fish Biology* 74(1): 2-17.
- Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications.

Persson L., Diehl S., Johansson L., Andersson G. & S. Hamrin (1992) Trophic interactions in temperate lake ecosystems: a test of food chain theory. *Am. Nat.* 140: 59–84.

Pfandl, K. & J. Boenigk (2006) Stuck in the mud: suspended sediments as a key issue for survival of chrysoomonad flagellates. *Aquatic Microbial Ecology* 45(1): 89-99.

Polis Gary A., Anna L. W. Sears, Gary R. Huxel, Donald R. Strong & John Maron (2000) When is a trophic cascade a trophic cascade? *Trends in Ecology & Evolution* Volume 15, Issue 11, 473-475

Polis, G. A. & D. R. Strong (1996) Food Web Complexity and Community Dynamics. *The American Naturalist* 147(5): 813.

Pomeroy LR (1974) Oceans Food Web, a Changing Paradigm. *Bioscience* 24: 499-504

Porter, K. G., E. B. Sherr, et al. (1985) Protozoa in Planktonic Food Webs. *Journal of Protozoology* 32(3): 409-415.

Pradeep Ram AS, Boucher D, Sime-Ngando T, Debroas D, Romagoux JC (2005) Phage bacteriolysis, protistan bacterivory, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. *Microb Ecol* 50:64-72

## **R**

Ramcharan, C. W., R. L. France, et al. (1996) Multiple effects of planktivorous fish on algae through a pelagic trophic cascade. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(12): 2819-2828.

Raven J. A. (1998) The twelfth Transley Lecture. Small is beautiful: the Picophytoplankton. *Funct. Ecol.* 12:503-513.

Reynolds, C. S. (2006) The ecology of phytoplankton. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge UK, Cambridge University Press.

Richards, T. A., A. A. Vepriksiv, D. E. Gouliamova & S. A. Nierzwicki-Bauer ( 2005) The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. *Environ. Microbiol.* 7: 1413-1425.

Riemann, L. & A. Winding (2001) Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology* 42(3): 274-285.

Rothhaupt, K. O. (1997) Nutrient turnover by freshwater bacterivorous flagellates: Differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquatic Microbial Ecology* 12(1): 65-70.

## **S**

Sabo, J. L., J. C. Finlay, et al. (2009) Food Chains in Freshwaters. *Year in Ecology and Conservation Biology* 2009 1162: 187-220.

Sanders, R. W., K. G. Porter, S. J. Bennett & A. E. Debiase (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnol. Oceanogr.* 34: 673-687.

Samuelsson, K. & A. Andersson (2003) Predation limitation in the pelagic microbial food web in an oligotrophic aquatic system. *Aquatic Microbial Ecology* 30(3): 239-250.

Sanders, R. W., D. A. Caron, et al. (1992) Relationships between Bacteria and Heterotrophic Nanoplankton in Marine and Fresh Waters - an Inter-Ecosystem Comparison. *Marine Ecology-Progress Series* 86(1): 1-14.

Sanders, R.W., U. G. Berninger, E. L. Lim, P. F. Kemp, D. A. Caron (2000) Heterotrophic and mixotrophic nanoplankton predation in the Sargasso Sea and on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192: 103-118.

- Sapp, M., A. S. Schwaderer, et al. (2007). Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial Ecology* 53(4): 683-699.
- Schelske, C. L. (2009). Eutrophication: Focus on Phosphorus. *Science* 324(5928): 722-722.
- Schindler D.W., Fee E.J. (1974) Experimental lakes area : whole-lake experiments in eutrophication. *J.Fish. Res. Board. Can.*, 31, 937-953.
- Schindler D.W., Hesslein R.H., Tuner M.A. (1987) Exchange of nutrients between sediments and water after 15 years of experimental eutrophication. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* , 44, 23-26.
- Schindler, D. E., S. R. Carpenter, et al. (1997) Influence of food web structure on carbon exchange between lakes and the atmosphere. *Science* 277(5323): 248-251.
- Schindler, D. W., R. E. Hecky, et al. (2008a) Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *PNAS* 105(32): 11254-11258.
- Schindler, D. W., A. P. Wolfe, et al. (2008b) The cultural eutrophication of Lac la Biche, Alberta, Canada: a paleoecological study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65(10): 2211-2223.
- Schindler, D. W. & R. E. Hecky (2009) Eutrophication: More Nitrogen Data Needed. *Science* 324(5928): 721-722.
- Selje, N. & M. Simon (2003) Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquatic Microbial Ecology* 30(3): 221-237.
- Sherr, B. F. & Sherr, E. B. (1984) Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In: M.J. Klug and C. A. Reddy (eds), *Current perspectives in Microbial Ecology*. Amer. Soc. Microbiol., Washington: 412-423.
- Sherr, E.B. (1988) Direct use of high molecular weight polysaccharide by heterotrophic flagellates. *Nature*. 335: 1225-1227.
- Sherr, E. B. & B. F. Sherr (1994) Bacterivory and Herbivory - Key Roles of Phagotrophic Protists in Pelagic Food Webs. *Microbial Ecology* 28(2): 223-235.
- Sherr, E. B., B. F. Sherr & L. Fessenden (1997) Heterotrophic protists in the central Arctic Ocean. *Deep-Sea Res.* 44: 1665-1682.
- Simek K. & V. Straskrabova (1992) Bacterioplankton production and protozoan bacterivory in a mesotrophic reservoir. *Journal of plankton research* vol. 14 (6): 773-787
- Simek, K., M. Macek, et al. (1990) Possible Food-Chain Relationships between Bacterioplankton, Protozoans, and Cladocerans in a Reservoir. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie* 75(5): 583-596.
- Simek, K., M. Macek, et al. (1996) Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton? *Journal of Plankton Research* 18(4): 597-613.
- Simek K., K. Jürgens, J. Nedoma, M. Comerma, J. Armengol (2000) Ecological role and bacterial grazing of *Halteria* sp: small freshwater oligotrichs as dominant pelagic ciliate bacterivores, *Aquatic Microbial Ecology* 22 :43-56.
- Simek K. & 7 co-authors (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ.Microbiol.* 67 :2723-2733.

- Simek, K., M. G. Weinbauer, et al. (2007). Grazer and virus-induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. *Environ Microbiol* 9(3): 789-800.
- Šlapeta, J., D. Moreira, et al. (2005) The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272(1576): 2073-2081.
- Šlapeta, J., P. Lopez-Garcia, et al. (2006a) Present status of the molecular ecology of kathablepharids. *Protist* 157(1): 7-11.
- Šlapeta J., Moreira D., Lopez-Garcia P. (2006b) Global dispersal and ancient cryptic species in the smallest marine eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 23(1) 23-29.
- Smith, D. C., M. Simon, A. L. Alldredge & F. Azam (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359:139-142.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark Welch, D., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. & G.J. Herndl (2006) Microbial diversity in the deep sea and the under-explored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad.* 103
- Solic, M., N. Krstulovic, et al. Variability in the bottom-up and top-down controls of bacteria on trophic and temporal scales in the middle Adriatic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 58(1): 15-29.
- Stickney, H. L., R. R. Hood, et al. (2000) The impact of mixotrophy on planktonic marine ecosystems. *Ecological Modelling* 125(2-3): 203-230.
- Stoecker, D. K. (1998) Conceptual models of micotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implication. *Eur. J. Protistol.* 34: 281-290.
- Stockner J.G. & K.G. Porter (1988) Microbial food webs in freshwater planktonic ecosystems. In: S.J. CARPENTER [ed], *Complex interactions in lake communities*. Springer-Verlag, New York, 69-83.
- Stockner, J. G., and N. J. Antia (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 2472-2503.
- Stockner J. G., and K. S. Shortreed (1989) Algal picoplankton production and contribution to food-webs in oligotrophic British Columbia Lakes. *Hydrobiologia* 173: 151-166.
- Stockner J. G., & K. S. Shortreed (1991) Autotrophic picoplankton: Community composition, abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yukon territory lakes. *Int. Revues ges. Hydrobiol.* 76: 581-601.
- Suttle, C. A. (2007) Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5(10): 801-812.
- T**
- Tittel J, Wiehle I, Wannicke N, Kampe H, Poerschmann J, Meier J, & Kamjunke N. (2009) Utilisation of terrestrial carbon by osmotrophic algae. *Aquat Sci* 46-54.
- Thouvenot, A., M. Richardot, D. Debroas & J. Dévaux (1999) Bacterivory of metazooplankton, ciliates and flagellates in a newly flooded reservoir. *J. Plankton Res.* 21: 1659-1679.

Thingstad F (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol Oceanogr* 45:1320-1328

## **V**

Van Hannen, E. J., W. Mooij, M. P. van Agterveld, H. J. Gons & H. J. Laanbroek (1999) Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2478-2484.

Vezina AF (1989) Construction of flow networks using inverse methods. In: Wulff F, Field JG, Mann KH (eds) *Network analysis in marine ecology* Springer-Verlag, Berlin, p 62-81

Vezina AF, Pace ML (1994) An inverse model analysis of planktonic food webs In experimental lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 51(9):2034-2044

Vezina AF, Platt T (1988) Food web dynamics in the oceans. Best-estimates of flow networks using inverse methods. *Mar Ecol Prog Ser* 42:269-287

Volleinweider R.A. (1968) Les bases scientifiques de l'eutrophisation des lacs et des eaux courantes sous l'aspect particulier du phosphore et de l'azote comme facteurs d'eutrophisation. OCDE 182pp

Vrede, T. & K. Vrede (2005) Contrasting Top-Down Effects of Crustacean Zooplankton Grazing on Bacteria and Phytoflagellates. *Aquatic Ecology* 39(3): 283-293.

## **W**

Weinbauer, M. G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *Fems Microbiology Reviews* 28(2): 127-181.

Weinbauer, M. G. & F. Rassoulzadegan (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* 6(1): 1-11.

Weinbauer, M. G., Y. Bettarel, et al. (2009) Viral ecology of organic and inorganic particles in aquatic systems: avenues for further research. *Aquatic Microbial Ecology* 57(3): 321-341.

Weisse, T., H. Müller, et al. (1990) Response of the Microbial Loop to the Phytoplankton Spring Bloom in a Large Prealpine Lake. *Limnology and Oceanography* 35(4): 781-794.

Weisse, T. & H. Müller (1998) Planktonic protozoa and the microbial food web in Lake Constance. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issue Advanc. Limnol.* 53: 223-254.

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51: 221-271.

Worden, A. Z. (2006) Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 43(2): 165-175.

Work K. & Havens K.E. (2003) Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake *Journal of plankton research* 25(10) : 1301-1306

## **Z**

Zhang, N., J. Guo, et al. (2007) Soil microbial feedbacks to climate warming and atmospheric n deposition. *Journal of Plant Ecology* 31(2).

Zippel, B. & M. Schimmele (1999) Composition and dynamics of autotrophic picoplankton and spectral light distribution in saline lignite mining lakes of Germany. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 2(3): 319 - 329.



## **Annexe 1**



**Extrait du document d'évaluation présenté à l'AERES :  
EQUIPE BioFEEL - PERSPECTIVES 2005-2009**

**AXE 3 DE L'EQUIPE :**

**PROJET EMERGENT CONCERNANT LES FACTEURS DE REGULATIONS ABIOTIQUES : UTILISATION DES MATIERES ORGANIQUES - ROLE DU CARBONE TERRESTRE DANS LES LACS PERI-ALPINS**

*Responsables scientifiques : Projet commun Perga Tadonleke Jacquet Domaizon*

La plupart des lacs à l'échelle planétaire sont des sources de CO<sub>2</sub> pour l'atmosphère (Cole, 1994). La sursaturation en CO<sub>2</sub> de ces lacs vis-à-vis de l'atmosphère implique que la respiration totale des communautés microbiennes et métazoaires excède la production primaire (Del Giorgio, 1993), et par conséquent que ces communautés métabolisent, en plus du C organique (CO) produit au sein du lac, du CO d'origine terrestre. Le rôle du CO terrestre sur les réseaux trophiques aquatiques a été largement sous-estimé, notamment à cause de l'*apriori* selon lequel ce CO d'origine terrestre serait réfractaire et peu disponible pour les communautés aquatiques. Cependant, la littérature récente atteste d'un intérêt croissant quant au rôle structurant et métabolique de ces apports de CO allochtone dans les lacs (Karlsson, 2007; Lennon, 2004; Carpenter, 2005). La compréhension du rôle de ce carbone terrestre est d'autant plus nécessaire que les changements globaux sont susceptibles de largement modifier les apports de matière organique terrestre aux systèmes aquatiques continentaux (ainsi que la pénétration de la lumière nécessaire à la photosynthèse et donc le métabolisme global des lacs).

Ces processus ont été abordés à l'échelle du compartiment microbien, *via* notamment des mesures *in-* ou *ex-situ* de production et de respiration, ainsi qu'à l'échelle des consommateurs supérieurs, notamment par des méthodes de traceurs trophiques (isotopes stables et acides gras). Les résultats varient cependant largement d'un système à l'autre, ne permettant ainsi pas la mise en place d'une théorie unificatrice similaire au « River Continuum Concept » en rivières. A l'échelle microbienne, certains résultats montrent que le CO d'origine terrestre peut supporter en large proportion la production microbienne (Tranvik et al., 1987), tandis que d'autres suggèrent que ce carbone terrestre, réfractaire et peu labile, est essentiellement respiré, et contribue par conséquent peu à la production de biomasse (Kritzberg et al., 2004). A l'échelle des consommateurs supérieurs, et notamment du zooplancton, on retrouve le même genre de contradictions (Cole, 2002, 2006 ; Grey, 2000, 2001). Les études se sont essentiellement concentrées jusqu'à présent sur de petits lacs humiques oligotrophes, avec l'*a priori* que ce sont dans ces systèmes qu'une contribution maximale du CO terrestre à la production secondaire lacustre est attendue. Parmi les 36 estimations de contribution du CO terrestre à la production du zooplancton recensées dans la littérature, 34 sont consacrées à des lacs de taille inférieure à 600 ha, avec des concentrations en P<sub>tot</sub> <10 µg.l<sup>-1</sup>. Pourtant, ces études montrent que la contribution du CO terrestre à la production zooplanctonique de ces lacs varie de 0 à 100%. Nos résultats récents attestent de plus que la contribution du C terrestre aux réseaux trophiques lacustres peut aussi être significative dans des grands lacs clairs, tels que le lac d'Annecy (128).

Il y a plusieurs raisons potentielles aux contradictions apparentes du rôle joué par le carbone terrestre sur les réseaux trophiques des lacs. Rares sont les études qui prennent en compte la nature et la qualité des apports de matières organiques terrestres (dissoute, particulaire, âge, structure chimique), ainsi que l'hydrologie, les voies et « timing » des apports de ce CO terrestre vers les lacs. Peu d'études s'attachent aussi à la nature et à la couverture du bassin versant, ainsi qu'aux caractéristiques du milieu récepteur (temps de résidence, concentrations en nutriments). Le rôle potentiel joué par la photodégradation est aussi peu abordé.

Le projet de recherche que souhaite initier l'équipe BIOFEEL vise à étudier le rôle joué par ce CO terrestre dans les lacs péri-alpins, pour lesquels aucune estimation n'a encore été réalisée.

Une première étape envisagée, dès l'année 2010, consistera à évaluer les flux de CO<sub>2</sub> (et les concentrations en oxygène) dans différents lacs clairs péri-alpins en relations avec les concentrations de carbone organique dissous, ceci, afin de faire un état des lieux sur nos lacs d'intérêt (l'utilisation de cloches flottantes est prévue dans cette approche).

Par ailleurs la mise en œuvre d'approches basées sur le couplage entre isotopes stables et biomarqueurs doit nous fournir des outils pertinents pour aborder ce sujet, notamment pour le rôle des matières organiques dans le fonctionnement des réseaux planctoniques. L'approche DNA-SIP (DNA-stable isotope probing) sera développée pour identifier, avec fine résolution, les bactéries impliquées dans l'utilisation de la matière organique dissoute. Cette approche est proposée comme un 'work package' dans le Projet SENDEFO financé par l'ANR CES (2010-2013, coordination J-F humber & D. Debros). Par ailleurs, dans le cadre de cette démarche, un projet innovant est d'ores et déjà en cours (département EFPA INRA, 2009), afin d'analyser expérimentalement (à l'aide d'isotopes stables et des marqueurs microbiens) l'influence du niveau de nutriments sur la diversité des bactéries des lacs **et leur utilisation de la matière organique dissoute**.

Les travaux évoqués ici sont exploratoires et se veulent fondateurs pour poser les bases d'un projet de plus grande envergure dont l'objectif sera d'évaluer le rôle structurant et fonctionnel du C terrestre dans les lacs alpins, des virus aux compartiments supérieurs, à l'horizon 2011. Une première ébauche de ce projet existe au travers d'un document récemment rédigé, projet dont le but est d'analyser et de modéliser les interactions entre la MOD, les producteurs primaires (phytoplancton), les bactéries hétérotrophes (principaux organismes impliqués dans la respiration) et le rayonnement lumineux incident et pénétrant dans la colonne d'eau, L'originalité de ce projet est de considérer à la fois les

caractéristiques chimiques (en collaboration avec le LCME Univ. de Savoie) ainsi que les voies de transports et l'hydrologie (en relation avec l'UMR EDYTEM Univ. de Savoie). Ce programme vise à la fois des approches contemporaines et paléo-limnologiques.

La mise en place de Mésocosmes *in situ* est largement motivée par les questions de recherche évoquées ci avant. De nombreuses questions pourraient être étudiées sur la base d'approches expérimentales en mésocosmes : les transferts de matières organiques (marquées) et la problématique des ressources en carbone allochtone (terrestre) *versus* autochtone ; les interactions nutriments inorganiques-matières organiques ; les relations trophiques soumises aux facteurs de contrôles abiotiques (réduction *vs.* ajout de nutriments, température,...)

***Collaborations dans le cadre de ces projets :***

*Institut Physique du Globe Paris*

*UMR Microbiologie et Géochimies des Sols, Dijon*

*Université de Sienna, Italie ;*

*UMR CNRS EDYTEM Univ de Savoie ; LCME Univ de Savoie*



## **Annexe 2**

**1<sup>eres</sup> pages des publications parues**

# Community Structure and Dynamics of Small Eukaryotes Targeted by New Oligonucleotide Probes: New Insight into the Lacustrine Microbial Food Web<sup>∇</sup>

Jean-François Mangot,<sup>1</sup> Cécile Lepère,<sup>4,5</sup> Christophe Bouvier,<sup>1</sup>  
Didier Debroas,<sup>2</sup> and Isabelle Domaizon<sup>1,3\*</sup>

Université de Savoie, UMR 42 CARRTEL, F-73376 Le Bourget du Lac,<sup>1</sup> Université Blaise Pascal, UMR 6023 LGME, F-63177 Aubière,<sup>2</sup> INRA, UMR 42 CARRTEL, F-74200 Thonon les Bains,<sup>3</sup> and UPMC (Paris 06), UMR CNRS 7144, Station Biologique, Roscoff,<sup>5</sup> France, and Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry, United Kingdom<sup>4</sup>

Received 13 March 2009/Accepted 28 July 2009

The seasonal dynamics of the small eukaryotic fraction (cell diameter, 0.2 to 5  $\mu\text{m}$ ) was investigated in a mesotrophic lake by tyramide signal amplification–fluorescence in situ hybridization targeting seven different phylogenetic groups: Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Cercozoa, LKM11, Perkinsozoa (two clades), and Fungi. The abundance of small eukaryotes ranged from 1,692 to 10,782 cells  $\text{ml}^{-1}$ . The dominant groups were the Chrysophyceae and the Chlorophyceae, which represented 19.6% and 17.9% of small eukaryotes, respectively. The results also confirmed the quantitative importance of putative parasites, Fungi and Perkinsozoa, in the small heterotrophic eukaryotic assemblage. The relative abundances recorded for the Perkinsozoa group reached as much as 31.6% of total targeted eukaryotes during the summer. The dynamics of Perkinsozoa clade 1 coincided with abundance variations in *Peridinium* and *Ceratium* spp. (Dinoflagellates), while the dynamics of Perkinsozoa clade 2 was linked to the presence of *Dinobryon* spp. (Chrysophyceae). Fungi, represented by chytrids, reached maximal abundance in December (569 cells  $\text{ml}^{-1}$ ) and were mainly correlated with the dynamics of diatoms, especially *Melosira varians*. A further new finding of this study is the recurrent presence of Cercozoa (6.2%) and LKM11 (4.5%) cells. This quantitative approach based on newly designed probes offers a promising means of in-depth analysis of microbial food webs in lakes, especially by revealing the phylogenetic composition of the small heterotrophic flagellate assemblage, for which an important fraction of cells are generally unidentified by classical microscopy (on average, 96.8% of the small heterotrophic flagellates were identified by the specific probes we used in this study).

Recently developed molecular methods based on the amplification and sequencing of rRNA genes have made it possible to investigate picoeukaryote assemblage composition (pigmented or nonpigmented unicellular eukaryotes with cell diameters of  $<2 \mu\text{m}$  or  $<5 \mu\text{m}$  according to the studies) in various aquatic systems, independently of morphological identification and cultivation (14, 23, 27, 28, 29, 39). The essential role of picoplankton (both eukaryotic and prokaryotic) as a contributor to plankton biomass and to carbon and nutrient cycling has long been established (9), but the unexpected diversity among the smallest eukaryotes (cell diameters,  $<5 \mu\text{m}$ ) was only recently revealed. Most of these data were obtained in oceanic systems, but a few recent studies conducted in lakes have also highlighted the broad diversity of 18S rRNA sequences affiliated with numerous phylogenetic groups: Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Cercozoa, Fungi, Choanoflagellida, Bicosoecida, Ciliophora, Haptophyceae, Perkinsozoa, LKM11, Hyphochytridiomycota, Katablepharidaceae, Dinophyceae, and Eustigmatophyceae (22, 23, 24, 34). Thus, it has been possible to observe clear seasonal changes in small-eukaryote structure in an oligomesotrophic lake (23), and the

lake-based studies generally report a dominance of heterotrophic cells within the lacustrine small-eukaryote assemblage. Moreover, the recurrent presence of sequences affiliated with parasitic groups has been highlighted in lakes of various trophic statuses (22, 23). Lepère et al. (25) reported the unexpected importance of two groups: first, fungi affiliated with two clades of chytrids known as parasites of various groups of microalgae; and second, members of the phylum Perkinsozoa belonging to two clades closely related to *Perkinsus marinus* and *Parvilucifera infectans*, which are parasites of bivalves and dinoflagellates, respectively (30), and whose systematic position has been controversial, since they are phylogenetically related to the Apicomplexa or the Dinoflagellata (6, 13).

Although these data brought new insight into the structural diversity of lacustrine small eukaryotes, the relative importance, dynamics, and functional roles of these microorganisms from various phylogenetic groups are still largely unknown. We now need to research specific in situ abundances of previously undetected taxa. In this study, specially developed oligonucleotide probes, designed on the basis of molecular data obtained from sequencing (20, 21, 22, 23, 24, 25, 34), were used for fluorescence in situ hybridization (FISH) coupled with tyramide signal amplification (TSA) to investigate the composition, abundance, and dynamics of lacustrine small eukaryotes ( $<5 \mu\text{m}$ ) in the mesotrophic Lake Bourget over 1 year. Special attention was paid to the dynamics of putative parasitic groups (Perkinsozoa, Fungi, Cercozoa).

\* Corresponding author. Mailing address: Université de Savoie, UMR 42 CARRTEL, F73376 Le Bourget du Lac, France. Phone: 33 (0) 479758861. Fax: 33 (0) 479758880. E-mail: isabelle.domaizon@univ-savoie.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 7 August 2009.

# Seasonal variations of microbial abundances and virus- versus flagellate-induced mortality of picoplankton in three peri-alpine lakes

SÉBASTIEN PERSONNIC<sup>1,2</sup>, ISABELLE DOMAIZON<sup>3</sup>, TÉLESPHORE SIME-NGANDO<sup>4</sup> AND STÉPHAN JACQUET<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR GARRTEL, STATION D'HYDROBIOLOGIE LACUSTRE, 74203 THONON-LES-BAINS CEDEX, FRANCE, <sup>2</sup>UNIVERSITÉ DU SUD TOULON-VAR, LABORATOIRE PROTEE, 83957 LA GARDE CEDEX, FRANCE, <sup>3</sup>UNIVERSITÉ DE SAVOIE, UMR GARRTEL, 73376 LE BOURGET DU LAC CEDEX, FRANCE AND <sup>4</sup>UMR CNRS 6023, LAB. MICROORGANISMES: GÉNOME AND ENVIRONNEMENT UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL (CLERMONT-FERRAND II), 63177 AUBIÈRE CEDEX, FRANCE

\*CORRESPONDING AUTHOR: jacquet@thonon.inra.fr

Received March 11, 2009; accepted in principle June 11, 2009; accepted for publication June 14, 2009

Corresponding editor: William Li

*Viruses and small heterotrophic flagellates are known to exert an important control on bacterial populations. In parallel with the study of picoplankton dynamics (abundance and distribution) in surface waters (0–50 m) of Lakes Geneva, Bourget and Annecy, we used a dilution technique during different seasonal periods in order to assess flagellate- versus virus-induced mortality of heterotrophic bacteria, picocyanobacteria and small eukaryotic phytoplankton. Although it was not always possible to detect a significant viral effect (typically in winter), viral lysis and protozoan grazing could be responsible for up to 71% of the bacterial mortality (in summer). Viral impact, considered alone, never equalled or exceeded predation for heterotrophic bacteria, but could for picocyanobacteria, typically in autumn. In addition, during summer, complex interactions between grazing- and virus-induced mortality of bacteria (e.g. synergism versus antagonism) could be highlighted (for instance with bacterial lysis susceptible to enhance picocyanobacterial growth). The temporal variations observed for experimental viral parasitism and flagellate predation were consistent with the in situ dynamics and statistical relationships found between the targeted communities. This study thus provides new evidence on the critical role played by viruses and small flagellates in the functioning of freshwater microbial food webs and also that these mortality processes vary strongly throughout the seasons.*

## INTRODUCTION

In aquatic microbial ecology, the term picoplankton refers to a complex community of small size microbes (0.2–2 µm), including picophytoplankton (i.e. tiny autotrophs) and heterotrophic planktonic groups (i.e. mainly bacteria but also archaea and small eukaryotes). The picophytoplankton, composed of picocyanobacteria (e.g. *Synechococcus* like and *Prochlorococcus*) and picoeukaryotes, may contribute substantially to both total phytoplankton biomass and production in aquatic ecosystems

(Campbell and Vaultot, 1993; Li, 1994; Bustillos-Guzman *et al.*, 1995; Binder *et al.*, 1996; Buck *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1998; Callieri and Stokner, 2002), especially in oligotrophic waters where they can account for up to 90% of the total photosynthetic biomass and carbon production (Li *et al.*, 1983; Campbell *et al.*, 1994; Jardillier *et al.*, personal communication). It is now recognized that the bacterioplankton play a substantial role comparable to that of the primary producers in terms of element cycling in

2 **Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio-,**  
3 **and picophytoplanktonic abundances in three**  
4 **peri-alpine lakes**

5 Sébastien Personnic · Isabelle Domaizon ·  
6 Ursula Dorigo · Lyria Berdjeb · Stéphan Jacquet

7 Received: 26 September 2008 / Revised: 1 December 2008 / Accepted: 19 January 2009  
8 © Springer Science+Business Media B.V. 2009

9 **Abstract** Flow cytometry (FCM) was used to  
10 assess microbial community abundances and patterns  
11 in three natural, large and deep peri-alpine hydrosys-  
12 tems, i.e., lakes Annecy (oligotrophic), Bourget, and  
13 Geneva (mesotrophic). Picocyanobacteria, small  
14 eukaryotic autotrophs, heterotrophic prokaryotes,  
15 and viruses were studied in the 0–50 m surface  
16 layers to highlight the impact of both physical and  
17 chemical parameters as well as possible biotic  
18 interactions on the functioning of microbial commu-  
19 nities. Some specificities were recorded according to  
20 the trophic status of each ecosystem such as the  
21 higher number of viruses and heterotrophic bacteria  
22 in mesotrophic environments (i.e., Lakes Geneva and  
23 Bourget) or the higher abundance of picocyanobac-  
24 teria in the oligotrophic Lake Annecy. However, both  
25 seasonal (temperature) and spatial (depth) variations

were comparatively more important than the trophic 26  
status in driving the microbial communities' abun- 27  
dances in these three lakes, as revealed by principal 28  
component analysis (PCA). A strong viral termina- 29  
tion of the heterotrophic bacterial blooms could be 30  
observed in autumn for each lake, in parallel to the 31  
mixing of the upper lit layers. As virus to bacteria 32  
ratio (VBR) was indeed very high at this period with 33  
values varying between 87 and 114, such important 34  
relationships between viruses and bacteria were 35  
likely. The magnitudes of seasonal variations in 36  
VBR, with the highest values ever reported so far, 37  
were largely greater than the magnitude of theoretical 38  
variations due to the trophic status, suggesting also 39  
a strong seasonality in virioplankton production asso- 40  
ciated to prokaryotic dynamics. FCM analyses 41  
allowed discriminating several viral groups. Virus- 42  
Like Particles group 1 (VLP1) and group 2 (VLP2) 43  
were always observed and significantly correlated to 44  
bacteria for the former and chlorophyll *a* and 45  
picocyanobacteria for the latter, suggesting that most 46  
of VLP1 and VLP2 could be bacteriophages and 47  
cyanophages, respectively. On the basis of these 48  
results, new ways of investigation emerge concerning 49  
the study of relationships between specific picoplank- 50  
tonic groups; and overall these results provide new 51  
evidence of the necessity to consider further viruses 52  
for a better understanding of lake plankton ecology. 53

**Keywords** Viruses · Bacteria · Flow cytometry · 54  
Lake · Trophic status 55

A1 Handling editor: Luigi Naselli-Flores

A2 S. Personnic · U. Dorigo · L. Berdjeb · S. Jacquet (✉)  
A3 INRA, UMR CARRTEL, Station d'Hydrobiologie  
A4 Lacustre, 75 Avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains  
A5 cedex, France  
A6 e-mail: jacquet@thonon.inra.fr

A7 I. Domaizon  
A8 Université de Savoie, UMR CARRTEL,  
A9 73376 Le Bourget du Lac cedex, France



# Unexpected Importance of Potential Parasites in the Composition of the Freshwater Small-Eukaryote Community<sup>∇</sup>

Cécile Lepère,<sup>1</sup> Isabelle Domaizon,<sup>2</sup> and Didier Debroas<sup>1\*</sup>

Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, 63177 Aubière, France,<sup>1</sup> and Université de Savoie, UMR CARTELE, 73376 Le Bourget du Lac, France<sup>2</sup>

Received 23 May 2007/Accepted 7 March 2008

The diversity of small eukaryotes (0.2 to 5  $\mu\text{m}$ ) in a mesotrophic lake (Lake Bourget) was investigated using 18S rRNA gene library construction and fluorescent in situ hybridization coupled with tyramide signal amplification (TSA-FISH). Samples collected from the epilimnion on two dates were used to extend a data set previously obtained using similar approaches for lakes with a range of trophic types. A high level of diversity was recorded for this system with intermediate trophic status, and the main sequences from Lake Bourget were affiliated with ciliates (maximum, 19% of the operational taxonomic units [OTUs]), cryptophytes (33%), stramenopiles (13.2%), and cercozoa (9%). Although the comparison of TSA-FISH results and clone libraries suggested that the level of Chlorophyceae may have been underestimated using PCR with 18S rRNA primers, heterotrophic organisms dominated the small-eukaryote assemblage. We found that a large fraction of the sequences belonged to potential parasites of freshwater phytoplankton, including sequences affiliated with fungi and Perkinsozoa. On average, these sequences represented 30% of the OTUs (40% of the clones) obtained for each of two dates for Lake Bourget. Our results provide information on lacustrine small-eukaryote diversity and structure, adding to the phylogenetic data available for lakes with various trophic types.

It has been recognized that the eukaryotic component of picoplankton plays a critical role in the functioning of aquatic ecosystems (29, 34). However, numerous members of this community possess very few morphological characteristics that can be used for identification by traditional microscopic methods. Thus, molecular techniques offer a very useful alternative for the elucidation and description of picoeukaryotic plankton diversity in aquatic environments. Numerous studies have revealed new lineages and unexpected diversity of picoeukaryotes in the open ocean (7, 29, 37), coastal areas (35, 46), anaerobic sediments (5), acid rivers (2), and deep-sea vents (11, 30). However, the diversity, distribution, and natural abundance of small-eukaryote taxa in freshwater systems are still poorly known. Nevertheless, a few recent studies have reported high diversity of 18S rRNA sequences in this community (<5  $\mu\text{m}$ ) in lakes and general dominance of heterotrophic cells in the small-eukaryote assemblage (25, 27, 45). A salient feature of the first findings is the presence of sequences affiliated with parasitic groups in lakes with different trophic types (25). This suggests that the ecological impact of parasitism may have been underestimated in marine systems (31) and also in freshwater systems. However, the data on lacustrine small-eukaryote diversity are still largely incomplete, and additional investigation of the composition and organization of freshwater small-eukaryote assemblages is essential; in particular, no data are available for mesotrophic lakes.

To draw up an inventory of lacustrine picoplankton (<5  $\mu\text{m}$ ) over a full trophic status range (from oligotrophic to hyper-eutrophic), we set out to extend the currently available data by

characterizing the small-eukaryote community in mesotrophic Lake Bourget, using both fluorescent in situ hybridization (FISH) coupled with tyramide signal amplification (TSA) and a cloning-sequencing method. The results enabled us to identify the main phylogenetic groups present on two different sampling dates in the epilimnion of this lake and to describe the structure of the complex assemblage.

## MATERIALS AND METHODS

**Study site and sampling.** The study was conducted in mesotrophic Lake Bourget (45°44'N, 05°51'W; altitude, 231 m), France's largest natural lake. Lake Bourget is a warm, meromictic lake located in eastern France on the edge of the Alps. It suffered from eutrophication until the mid-1980s, before an important program of restoration began. This ecosystem is now considered a mesotrophic lake. The mean annual phosphorus concentration was 28  $\mu\text{g liter}^{-1}$  in 2005. The transparency values (secchi depths) for the two sampling dates in May and August were 9.6 and 5.2 m, respectively, while the concentrations of dissolved total P at a depth of 2 m were 13 and 8  $\mu\text{g/liter}$ . The lake is elongated (18 by 3.5 km) and orientated north-south; it has an area of 42 km<sup>2</sup>, a total volume of 3.5  $\times 10^9$  m<sup>3</sup>, maximum and average depths of 145 and 80 m, respectively, and a water residence time of approximately 10 years. It has a catchment area of about 560 km<sup>2</sup> with maximum and average altitudes 184 m and 700 m, respectively. Sampling was carried out 2 m below the surface at a permanent station, which is the reference station for water quality surveys and is located in the deepest zone of the water column.

A previous exploratory analysis of small-eukaryote diversity was conducted for the epilimnion of Lake Bourget using terminal restriction fragment length polymorphism (RFLP). Terminal RFLP revealed that the greatest contrasts in the diversity profiles of the small-eukaryote community composition occurred in May (199 terminal restriction fragments) and August (130 terminal restriction fragments) (results not shown). Also, the abundance and composition of biological variables, such as heterotrophic bacteria and picocyanobacteria, flagellates, or ciliates, were also markedly different in May and August (4; S. Personnic and S. Jacquet, unpublished data). We therefore chose to carry out one cloning-sequencing analysis in May (16 May 2005) and one cloning-sequencing analysis in August (10 August 2005).

Between 100 and 120 ml of lake water from the initial water samples was prefiltered through 5- $\mu\text{m}$ -pore-size polycarbonate filters (Millipore) at a pressure of <20  $\times 10^5$  Pa in order to eliminate larger cells. It is well known that whatever the aquatic ecosystem, the prefiltration process allows passage of cells

\* Corresponding author. Mailing address: Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, 63117 Aubière, France. Phone: 33 473407837. Fax: 33 473407670. E-mail: didier.debras@free.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 21 March 2008.



T. Sime-Ngando · J. Colombet · S. Personnic  
I. Domaizon · U. Dorigo · P. Perney  
J. C. Hustache · E. Viollier · S. Jacquet

## Short-term variations in abundances and potential activities of viruses, bacteria and nanoprotists in Lake Bourget

Received: 11 July 2007 / Accepted: 3 November 2007 / Published online: 12 December 2007  
© The Ecological Society of Japan 2007

**Abstract** Samples were collected at four depths every 6 h over a 42-h period during two contrasting seasons (June vs. December) from Lake Bourget, France, for evidence of circadian fluctuations in the concentrations and potential activities of viruses, prokaryotes and protists in relation to environmental conditions: temperature, chlorophyll *a* and dissolved organic carbon (DOC) concentrations. Considerable vertical and temporal fluctuations were observed for all variables. Circadian variations were noted for DOC and chlorophyll *a* concentrations. Despite the external abiotic forcing (light, water movements), the fluctuations of microbial variables (including viruses) in most cases were apparently linked to biotic factors and interactions. Standing stocks and activities, as well as the number and levels of correlations among the microbial components, were, surprisingly, higher in winter than in summer. We speculate that this was because trophic interactions prevailed over the seasonal forcing (i.e. temperature) in shaping the observed differences.

**Keywords** Lakes · Diurnal cycles · Viruses · Virioplankton · Bacteria · Protists

T. Sime-Ngando (✉) · J. Colombet  
UMR CNRS 6023, Biologie des Protistes,  
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II,  
63177 Aubière Cedex, France  
E-mail: Telesphore.SIME-NGANDO@univ-bpclermont.fr  
Tel.: +33-4-73407836  
Fax: +33-4-73407670

S. Personnic · U. Dorigo · P. Perney · J. C. Hustache · S. Jacquet  
UMR CARTELE, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre,  
74203 Thonon Cedex, France

I. Domaizon  
Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac Cedex, France

E. Viollier  
UMR CNRS 7047, Géochimie des Eaux,  
Université Paris 7 et IGP, 75251 Paris Cedex 05, France

### Introduction

Because turnover rates are relatively high, species composition, cell counts, biomass and activities of pelagic microorganisms can vary substantially over short time scales (Sime-Ngando and Hartmann 1991; Amblard et al. 1994; Jugnia et al. 2000; Winter et al. 2004). Some microorganisms, such as ciliates, are motile, chemosensory and photosensitive, and others, such as copepods, can migrate vertically on a diel cycle (see Sime-Ngando and Hartmann 1991). In general, fluctuations in both biotic and abiotic parameters are discernible in pelagic ecosystems at the time scale of diurnal cycles.

Basically, this is because both autotrophic and heterotrophic processes depend on factors as obvious as light. Light can govern cycles of resources, such as phytoplankton exudates, and influence heterotrophic processes. Light can also influence the mortality of pelagic microbes, either directly through DNA damage (Herndl et al. 1993; Jeffrey et al. 1996) or indirectly, since it is a dominant mechanism of viral destruction and inactivation (Suttle and Chen 1992; Wommack et al. 1996; Noble and Fuhrman 1997; Weinbauer et al. 1997). Enhanced solar ultraviolet exposure has also been shown to be an inhibitory factor for nanoflagellate bacterivory (Ochs 1997; Ochs and Eddy 1998). Other studies have concluded that light may stimulate heterotrophic processes, such as photoenzymatic activity or photoreactivation (i.e. light-dependent DNA repair) in a bacterial community (Weinbauer et al. 1997) and may also facilitate digestion, grazing and growth rates of protozooplankton (Strom 2001). The direct impact of light on crustacean zooplankton and ichthyoplankton has also been partially tested (Browman et al. 2000).

However, it is usually difficult to differentiate the causes of short-term variability in natural communities. In addition to external abiotic forcing and day–night cycles, a mixture of factors such as water movements, turbulence, population dynamics and interactions may be involved (Sime-Ngando and Hartmann 1991;

# Community composition of lacustrine small eukaryotes in hyper-eutrophic conditions in relation to top-down and bottom-up factors

Cécile Lepère<sup>1,2</sup>, Isabelle Domaizon<sup>2</sup> & Didier Debroas<sup>1</sup><sup>1</sup>Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes, Aubière, France; and <sup>2</sup>Université de Savoie, Laboratoire CARRTEL, Le Bourget du Lac, France

**Correspondence:** Didier Debroas, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, 63177 Aubière, France. Tel.: +33 473 407837; fax: +33 473407837; e-mail: didier.debroas@free.fr

Received 8 November 2006; revised 4 May 2007; accepted 4 May 2007.  
First published online 26 July 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2007.00359.x

Editor: Patricia Sobczyk

## Keywords

small eukaryotes; lake; 18S rRNA; T-RFLP; cloning–sequencing; mesocosm experiment.

## Abstract

Small eukaryotes (0.2–5 µm) in hyper-eutrophic conditions were described using terminal restriction fragment length polymorphism and cloning–sequencing, and were related to environmental variables both by an experimental approach and by a temporal field study. *In situ* analysis showed marked temporal variations in the dominant terminal restriction fragments (T-RFs), which were related to environmental variables such as nutrient concentrations and metazooplankton composition. To monitor the responses of the small-eukaryote community to top-down (absence or presence of planktivorous fish) and bottom-up (low or high nitrogen and phosphorus addition) effects, a cross-classified design mesocosm experiment was used. Depending on the type of treatment, we recorded changes in the diversity of T-RFs, as well as modifications in phylogenetic composition. Centroheliocystis and Cryptophyta were found in all types of treatment, whereas Chlorophyta were specific to enclosures receiving high nutrient loadings, and were associated either with LKM11 and 'environmental sequences'. Cercozoa and Fungi were not detected in enclosures receiving high nutrient loadings and fishes. Our results showed that resources and top-down factors are both clearly involved in shaping the structure of small eukaryotes, not only autotrophs but also heterotrophs, via complex interactions and trophic cascades within a microbial loop, notably in response to nutrient loading.

## Introduction

Small eukaryotes (0.2–5 µm) are found in both marine and freshwater ecosystems, accounting for a significant fraction of the biomass (Stockner & Antia, 1986; Courties *et al.*, 1994; Li, 1994; Fogg, 1995). They are likely to belong to various functional groups, and thus to play important roles as autotrophs, heterotrophs or mixotrophs. Because of its importance, the diversity and distribution of the small-eukaryote community have recently received considerable attention with newly developed molecular techniques. Studies have generally focused on marine food webs, however, and consequently the diversity, distribution and natural abundance of the freshwater small-eukaryote taxa are largely unknown. Only two recent studies have dealt with small-eukaryote diversity in lakes, and they reported a large diversity of rRNA sequences within this community (< 5 µm in size) (Lefranc *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2005). Furthermore, some seasonal changes in small-eukaryote

diversity structure were recently observed during a study conducted over two consecutive years in an oligomesotrophic lake (Lepère *et al.*, 2006).

The modification in small-eukaryote community composition (SECC) through time raises the question of how regulatory factors, such as grazing (top-down) and resources (bottom-up), exert pressure on this community. Within metazooplankton, all the main groups (cladocerans, copepods and rotifers) are able to have a significant predation effect on small eukaryotic cell abundance (Banse, 1992). Among protists, nanoflagellates and small ciliates (Scuticociliates, small Oligotrichidea) may also be potential grazers of picoplankton (Simek *et al.*, 1995; Reckermann & Veldhuis, 1997; Samuelsson & Andersson, 2003). Moreover, several studies have shown that, in addition to grazing, viruses are a further important cause of mortality among prokaryotes and eukaryotes (Suttle *et al.*, 1990; Weinbauer & Höfle, 1998; Jacquet *et al.*, 2005). As regards bottom-up regulation, the picophytoplankton is dependent on the

# Do small grazers influence virus-induced mortality of bacteria in Lake Bourget (France)?

Stéphan Jacquet<sup>1, \*</sup>, Isabelle Domaizon<sup>2</sup>, Sébastien Personnic<sup>1</sup> and Télésphore Sime-Ngando<sup>3</sup>

With 1 figure and 2 tables

**Abstract:** We performed simple tests to assess the importance of the presence or absence of small flagellated predators on the stimulation of viral-induced bacterial mortality (VIBM) in Lake Bourget (France) during three periods of the year (March–April, May and August 2003). To achieve this goal, samples were filtered either through < 5 or < 1.2  $\mu\text{m}$  filters in order to keep or eliminate the smallest predators. We found that the VIBM was always enhanced in the presence of the predators after only 24 h. The viral impact was multiplied by about 8-fold at the end of March, 2.5-fold in May and 7-fold in August in the < 5  $\mu\text{m}$  compared to the < 1.2  $\mu\text{m}$  treatment. A clear and positive relationship was found between flagellates concentrations and the VIBM ( $r = 0.99$ ,  $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ). Our results highlight a tight coupling between the different compartments of the aquatic microbial loop, and more especially what could be a synergistic cooperation between grazing- and virus-induced mortality of bacteria.

**Key words:** Viruses, protists, bacteria, bacterial mortality, lake.

## Introduction

Viruses are known to be the most abundant biological entities in pelagic systems (Wommack & Colwell 2000, Sime-Ngando et al. 2003, Weinbauer 2004) where they play important roles in the mortality and diversity of prokaryotes, as well as in biogeochemical cycling (Fuhrman 1999, Wilhem & Suttle 1999, Weinbauer & Rassoulzadegan 2004). In terms of viral-induced bacterial mortality in aquatic ecosystems, it has been clearly shown that viruses can be an important regulation factor with impact ranging from 10 to 60 % of daily bacterial production removal (reviewed by Wommack & Colwell 2000, Jacquet et al. 2005a).

Some studies have investigated the relative importance of viral lysis and protozoan grazing simultaneously, especially in freshwater ecosystems (e.g. Jacquet et al. 2005a). All but a few of the available studies have reported lower mean viral lysis than protistan grazing. For instance, Fischer & Velimirov (2002) have reported a lower grazing predation on bacteria than viral lysis, ranging from 55.7 to 62.7 % of bacterial production, i.e. eleven-fold greater than the heterotrophic nanoflagellates grazing impact. Bettarel et al. (2004) also have reported at times that viral lysis could prevail over protistan grazing in the anoxic hypolimnion zone of the eutrophic Lake Aydat. An other study by Pradeep Ram et al. (2005) reported that the

<sup>1</sup> **Authors' addresses:** INRA, UMR CARRTEL, Equipe d'Ecologie Microbienne Aquatique, Station d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon cedex, France.

<sup>2</sup> UMR CARRTEL, Equipe d'Ecologie Microbienne Aquatique, Université de Savoie, 73376 Le Bourget-du-Lac cedex, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Biologie des Protistes, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand 2), UMR CNRS 6023, Campus des Cézeaux, 63177 Aubière cedex, France.

\* Corresponding author; E-mail: jacquet@thonon.inra.fr

## Microbial Community Structure and Dynamics in the Largest Natural French Lake (Lake Bourget)

J. Comte<sup>1</sup>, S. Jacquet<sup>2</sup>, S. Viboud<sup>1</sup>, D. Fontvieille<sup>1</sup>, A. Millery<sup>1</sup>, G. Paolini<sup>3</sup> and I. Domaizon<sup>1</sup>

(1) UMR CARRTEL, Université de Savoie, Equipe de Microbiologie Aquatique, 73376 Le Bourget-du-Lac Cedex, France

(2) UMR CARRTEL, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, Equipe de Microbiologie Aquatique, 74203 Thonon Cedex, France

(3) Cellule Technique de l'Aquarium du Bourget, 73100 Aix-les-Bains France

Received: 22 October 2003 / Accepted: 10 August 2004 / Online publication: 29 May 2006

### Abstract

We investigated the dynamics and diversity of heterotrophic bacteria, autotrophic and heterotrophic flagellates, and ciliates from March to July 2002 in the surface waters (0–50 m) of Lake Bourget. The heterotrophic bacteria consisted mainly of “small” cocci, but filaments (>2 µm), commonly considered to be grazing-resistant forms under increased nanoflagellate grazing, were also detected. These elongated cells mainly belonged to the *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) cluster, and were most abundant during spring and early summer, when mixotrophic or heterotrophic flagellates were the main bacterial predators. The CF group strongly dominated fluorescent *in situ* hybridization–detected cells from March to June, whereas clear changes were observed in early summer when Beta-proteobacteria and Alpha-proteobacteria increased concomitantly with maximal protist grazing pressures. The analysis of protist community structure revealed that the flagellates consisted mainly of cryptomonad forms. The dynamics of *Cryptomonas* sp. and *Dinobryon* sp. suggested the potential importance of mixotrophs as consumers of bacteria. This point was verified by an experimental approach based on fluorescent microbeads to assess the potential grazing impact of all protist taxa in the epilimnion. From the results, three distinct periods in the functioning of the epilimnetic microbial loop were identified. In early spring, mixotrophic and heterotrophic flagellates constituted the main bacterivores, and were regulated by the availability of their resources mainly during April (phase 1). Once the “clear water phase” was established, the predation pressure of metazooplankton represented a strong top-down force on all microbial compartments. During this period only

mixotrophic flagellates occasionally exerted a significant bacterivory pressure (phase 2). Finally, the early summer was characterized by the highest protozoan grazing impact and by a rapid shift in the carbon pathway transfer, with a fast change-over of the main predators contribution, i.e., mixotrophic, heterotrophic flagellates and ciliates in bacterial mortality. The high abundance of ciliates during this period was consistent with the high densities of resources (heterotrophic nanoflagellates, algae, bacteria) in deep layers containing the most chlorophyll. Bacteria, as ciliates, responded clearly to increasing phytoplankton abundance, and although bacterial grazing impact could vary largely, bacterial abundance seemed to be primarily bottom-up regulated (phase 3).

### Introduction

Pelagic microbial ecosystems are characterized by a complex set of dynamic interactions between organisms. Competition for nutrients and light, commensalism between autotrophs and heterotrophic bacteria, recycling of material, cell lysis, and predation are typical processes implicated in the ecological interactions between viruses, bacteria, micro-algae, and their predators (flagellates, ciliates, microzooplankton). Top-down (grazing), bottom-up (nutrient availability, amount of prey) controls and viral lysis are primarily responsible for microbial population structure and diversity, and they operate simultaneously rather than separately.

Since the seminal papers of Pomeroy [57] and Azam et al. [6], heterotrophic bacteria have been shown to play a crucial role in aquatic ecosystems, as the principal decomposers of organic matter [79], and as a main food source for microorganisms at the base of the trophic web [28, 37, 70]. The regulation of bacterial biomass, productivity, and community structure by nutrients (both organic and inorganic) and grazing (by single-cell and multicel-

Correspondence to: I. Domaizon; E-mail: isabelle.domaizon@univ-savoie.fr

## Succession and Regulation Factors of Small Eukaryote Community Composition in a Lacustrine Ecosystem (Lake Pavin)

Cécile Lepère,<sup>1</sup> Delphine Boucher,<sup>1</sup> Ludwig Jardillier,<sup>1</sup> Isabelle Domaizon,<sup>2</sup> and Didier Debroas<sup>1,\*</sup>

Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, 63177 Aubière, France,<sup>1</sup> and  
Université de Savoie, UMR CARTELE, 73376 Le Bourget du Lac, France<sup>2</sup>

Received 3 November 2005/Accepted 30 January 2006

The structure and dynamics of small eukaryotes (cells with a diameter less than 5  $\mu\text{m}$ ) were studied over two consecutive years in an oligomesotrophic lake (Lake Pavin in France). Water samples were collected at 5 and 30 m below the surface; when the lake was stratified, these depths corresponded to the epilimnion and hypolimnion. Changes in small-eukaryote structure were analyzed using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and cloning and sequencing of the 18S rRNA genes. Terminal restriction fragments from clones were used to reveal the dominant taxa in T-RFLP profiles of the environmental samples. *Spumella*-like cells (Chrysophyceae) did not dominate the small eukaryote community identified by molecular techniques in lacustrine ecosystems. Small eukaryotes appeared to be dominated by heterotrophic cells, particularly Cercozoa, which represented nearly half of the identified phylotypes, followed by the Fungi-LKM11 group (25%), choanoflagellates (10.3%) and Chrysophyceae (8.9%). Bicosoecida, Cryptophyta, and ciliates represented less than 9% of the community studied. No seasonal reproducibility in temporal evolution of the small-eukaryote community was observed from 1 year to the next. The T-RFLP patterns were related to bottom-up (resources) and top-down (grazing) variables using canonical correspondence analysis. The results showed a strong top-down regulation of small eukaryotes by zooplankton, more exactly, by cladocerans at 5 m and copepods at 30 m. Among bottom-up factors, temperature had a significant effect at both depths. The concentrations of nitrogenous nutrients and total phosphorus also had an effect on small-eukaryote dynamics at 5 m, whereas bacterial abundance and dissolved oxygen played a more important structuring role in the deeper zone.

Small phototrophic and heterotrophic eukaryotes (<5  $\mu\text{m}$ ) are found throughout the world's oceans and lakes at concentrations between  $10^2$  and  $10^4$  cells  $\text{ml}^{-1}$  in the photic zone (11). Small eukaryotes are known to be essential components in marine trophic food webs (20). The small-eukaryote assemblage is formed by picoalgae, which participate in primary production (55), by colorless heterotrophic cells, mostly flagellates, which are considered to be important grazers of prokaryotic and eukaryotic cells (11) and also play a significant role in the mineralization of organic matter, and finally by some small eukaryotes which can be mixotrophs. Despite the ecological importance of small eukaryotes and the general lack of distinct morphological features of these small cells, they have only recently been studied from a molecular perspective (20, 37). Thanks to these techniques, recent studies, conducted in various environments, have revealed a surprisingly high diversity of small eukaryotes and the existence of novel lineages (39). For example, the genetic diversity of small eukaryotes from coastal waters showed the dominance of novel alveolates (from 36% to 62% of total sequences obtained in their libraries) and the importance of novel stramenopiles, which account for up to 10% of sequences (38, 63). Furthermore, Prasinophyceae generally constituted the most conspicuous photosynthetic group and have been detected in all clone libraries (21, 38, 49).

Deep-sea research has shown that novel stramenopiles may represent up to 23% of sequences and that pigmented organisms are dominant (20, 49). Thus, studies have generally focused on marine food webs, and freshwater picoplankton structure and dynamics have received little attention until now (32, 48).

Although these studies clearly provide better information on the diversity of the picoplanktonic community composition, factors involved in the regulation of these communities remain very poorly known. Indeed, only a few attempts have been made to relate the structure of picoplanktonic communities with biological, chemical, and physical variables in a lake. Some studies have reported seasonal changes in heterotrophic nanoflagellate community structure (15) in relation to environmental variables, such as grazing (top down), resources (bottom up), and viruses (25). Organisms such as cladocerans, especially the *Daphnia* genus, are well known for their high grazing pressure on a wide spectrum of particles (29). Other organisms, including large heterotrophic flagellates, may also belong to top-down regulation factors, consuming bacteria preferably (51) but also small eukaryotic algae (43). With regard to bottom-up regulation, picoplanktonic organisms are characterized by a high surface/volume ratio with a large surface for exchange, which favors nutrient uptake. Studies performed in lakes have shown that the contribution of the picophytoplankton to total phytoplankton biomass decreases with higher trophic status (2).

The aim of this work was to investigate the dynamics and diversity of small eukaryotes (<5  $\mu\text{m}$ ) over a 2-year study

\* Corresponding author. Mailing address: Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, 63117 Aubière, France. Phone: 33 473407837. E-mail: didier.debroas@free.fr.

# Estimates of protozoan- and viral-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France)

STÉPHAN JACQUET,\* ISABELLE DOMAIZON,<sup>†</sup> SÉBASTIEN PERSONNIC,\* ANGIA SRIRAM PRADEEP RAM,<sup>‡</sup> MIKAL HEDAL,<sup>§</sup> SOLANGE DUHAMEL\* AND TÉLESPHORE SIME-NGANDO<sup>‡</sup>

\*UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, Thonon cedex, France

<sup>†</sup>UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Université de Savoie, Le Bourget-du-Lac cedex, France

<sup>‡</sup>Laboratoire de Biologie des Protistes, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand 2), Campus des Cézeaux, Aubière cedex, France

<sup>§</sup>Laboratory of Microbiology, University of Bergen, Bergen, Norway

## SUMMARY

1. We performed three, 1-week *in situ* experiments in March–April (expt 1), May (expt 2) and August (expt 3) 2003 in order to assess protozoan and virus-induced mortality of heterotrophic bacteria in a French lake. Viral and bacterial abundances were obtained using flow cytometry (FCM) while protozoa were counted using epifluorescence microscopy (EFM).
2. A dilution approach, applied to pretreated grazer-free samples, allowed us to estimate that viral lysis could be responsible for 60% (expt 1), 35% (expt 2) and 52% (expt 3) of daily heterotrophic bacterial mortality. Flagellate (both mixotrophic and heterotrophic) grazing in untreated samples, was responsible for 56% (expt 1), 63% (expt 2) and 18% (expt 3) of daily heterotrophic bacteria removal.
3. These results therefore suggest that both viral lysis and flagellate grazing had a strong impact on bacterial mortality, and this impact varied seasonally.
4. From parallel transmission electron microscopy (TEM) analysis, we found that the burst size (i.e. the number of viruses potentially released per lysed cell) ranged from nine to 25 (expt 1), 10 to 35 (expt 2) and eight to 25 (expt 3). The percentage of infected heterotrophic bacteria was 5.7% (expt 1), 3.4% (expt 2) and 5.7% (expt 3) so that the calculated percentage of bacterial mortality induced by viruses was 6.3% (expt 1), 3.7% (expt 2) and 6.3% (expt 3).
5. It is clear that the dilution-FCM and TEM methods yielded different estimates of viral impact, although both methods revealed an increased impact of viruses during summer.

*Keywords:* bacteria, lake, mortality, protists, viruses

## Introduction

Over the past 15 years, it has been realised that viruses are an important component of aquatic microbial food webs. They have been shown to be important controlling agents in planktonic community composition, diversity and succession, playing a key role in cell mortality and nutrient cycles (Bergh

*et al.*, 1989; Suttle, 1994; Maranger & Bird, 1995; Fuhrman, 1999; Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Of additional ecological significance, the ability of aquatic viruses to transfer genetic material has been demonstrated (Chiura, 1997; Clokie *et al.*, 2003). A large majority of aquatic viral ecological studies have been carried out in seawater (see Wommack & Colwell, 2000; Sime-Ngando *et al.*, 2003; Weinbauer, 2004). Some freshwater systems have also been investigated, although less often, and these include rivers (Mathias, Kirschner & Velmirov, 1995; Farnell-Jackson & Ward, 2003), Antarctic lakes (Kepner, Wharton & Suttle,

Correspondence: Stéphan Jacquet, UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon cedex, France.  
E-mail: jacquet@thonon.inra.fr

---

# ASSESSING THE MICROBIAL COMMUNITY DYNAMICS AND THE ROLE OF BACTERIOPHAGES IN BACTERIAL MORTALITY IN LAKE GENEVA

*Dynamique des communautés microbiennes et rôle  
fonctionnel des virus bactériophages du lac Léman*

---

*Solange Dubamel, Isabelle Domaizon-Pialat, Sébastien Personnic, Stéphan Jacquet\**

\*Équipe de Microbiologie Aquatique, UMR CARRTEL / INRA - Station d'Hydrobiologie Lacustre 75, avenue de Corzent  
- BP 511 - 74203 Thonon cedex, France

Reçu le 5 janvier 2005, accepté le 16 mai 2005

---

## RÉSUMÉ

Il est aujourd'hui bien établi que l'on ne peut prétendre comprendre le rôle du vivant dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques sans répondre à un certain nombre de questions fondamentales telles que celles portant sur l'identité et l'abondance des organismes présents, leurs taux métaboliques et reproductifs, ou encore leurs fonctions précises dans l'écosystème. Dans les systèmes lacustres, l'omniprésence et le rôle-clé des processus microbiens ont été largement démontrés au cours des deux dernières décennies. Toutefois, les mécanismes de régulation ainsi que la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes demeurent un sujet central de la recherche actuelle. Si nous avons commencé à accumuler de grandes quantités d'informations concernant le compartiment bactérien, il n'en est pas de même pour le compartiment contenant les plus petites et les plus abondantes entités biologiques de la colonne d'eau : les virus. L'importance qualitative, quantitative et fonctionnelle des virus bactériophages et leur impact dans le contrôle et le déclin des communautés bactériennes dans les écosystèmes lacustres sont en effet encore mal connus. On sait aujourd'hui que les virus interviennent dans les processus de perte (mortalité) qui

affectent les communautés microbiennes, mais aussi dans la structure en taille, la composition et la régulation de la diversité des peuplements microbiens, dans le recyclage des nutriments inorganiques et de la redistribution de la matière organique.

Dans ce travail, nous avons étudié, pour la première fois, la dynamique des communautés microbiennes dans le plus grand lac naturel d'Europe occidentale (le lac Léman) entre février et juin 2004. Le dénombrement des différents micro-organismes (effectué à huit profondeurs comprises entre 0 et 50 m) a été obtenu via la cytométrie en flux et la microscopie à épifluorescence. Cette approche « écosystémique » nous a permis d'acquérir une image aussi précise que possible de la structure et de la dynamique de la communauté microbienne, composée des picocyanobactéries, des bactéries hétérotrophes, de petits eucaryotes flagellés et ciliés hétérotrophes et mixotrophes et enfin des virus. Typiquement, il a pu être mis en évidence des liens étroits entre certaines communautés, comme par exemple les bactéries et les virus du groupe VLP1 ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 72$ ), suggérés être, pour l'essentiel, représentatifs de la communauté des bactériophages.

Parallèlement au suivi limnologique des communautés, une approche expérimentale *in situ*, à différentes périodes de

---

\*Auteur pour correspondance :  
Tél. : +33 4 50 26 78 12  
Fax : + 33 4 50 26 07 60  
Courriel : jacquet@thonon.inra.fr

# Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir

Ludwig Jardillier<sup>1</sup>, Maryline Basset<sup>1</sup>, Isabelle Domaizon<sup>1,2</sup>, André Belan<sup>1</sup>, Christian Amblard<sup>1</sup>, Mathilde Richardot<sup>1</sup>, Didier Debroas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Blaise Pascal, Laboratoire de Biologie des Protistes UMR CNRS 6023. 63177 Aubière, France

<sup>2</sup>Present address: Université de Savoie, CARRTEL, 73376 Le Bourget du Lac, France

**ABSTRACT:** Temporal changes in the bacterial community composition (BCC) and the impact of resources and predation on this community composition have been studied in the euphotic zone of the Sep reservoir (France), using terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for Eubacteria (EUB338) and eubacterial subgroups. Net growth and grazing rates of the various subgroups were computed from experiments conducted in dialysis bags in the presence or absence of predators. There was a significant difference between the grazing rates of different bacterial groups and subclasses, the alpha-proteobacteria (ALF1b) were subjected to the highest grazing rate (max. 1.76 d<sup>-1</sup>). In contrast, the beta-proteobacteria (BET42a) seemed to be little consumed by bacterivorous organisms, and predation led to large variations in the grazing rates of *Cytophaga-Flavobacterium* (CF319a). The different composition of bacterial consumers (*Dinobryon* sp. and Cladocera) during the study could explain the observed differences in grazing impact. The mean net growth rates of total bacteria, EUB338, BET42a, ALF1b, and CF319a in dialysis bags without predators were 0.21, 0.69, 0.45, 0.50 and 0.84 d<sup>-1</sup>, respectively. Various statistical analyses indicated that the BCC could depend on the organic matter excreted by the phytoplankton. There were also positive correlations not only between net growth and/or net production of ALF1b and CF319a with the primary production and biomass of the main phytoplankton groups, but also between phytoplankton biomass, primary production (PP) and some operational taxonomic units (OTUs). Among the physical variables, input and output of water in the reservoir seem to play a role in determining the BCC in this ecosystem. The results suggest that the BCC depends on the combined impact of dominant substrate sources and selective predation by bacterial consumers.

**KEY WORDS:** Bacterial community composition · Top-down · Bottom-up · Reservoir · Terminal-restriction fragment length polymorphism · Fluorescent *in situ* hybridization

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

## INTRODUCTION

Heterotrophic bacteria are an important constituent of pelagic ecosystems, where they can account for a large proportion of the plankton biomass (Cho & Azam 1988); they are also considered to be the most stable component of plankton communities in terms of abundance (Jürgens & Güde 1994). However, this concept of stability is based on the fact that, until the recent

development of molecular ecology methods, bacteria were considered to be a homogeneous functional unit. Phylogenetic analyses have shown that there is a great diversity within the lacustrine pelagic bacterial plankton (Zwart et al. 2002), which is often dominated by the beta subclass of Proteobacteria (Méthé et al. 1998). More recently, Glöckner et al. (2000) demonstrated that the Actinobacteria class may be an important bacterio-plankton group in freshwater ecosystems.

\*Corresponding author. Email: didier.debroas@free.fr



# Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy – importance of mixotrophy

Isabelle Domaizon \*, Sylvie Viboud, Dominique Fontvieille

Université de Savoie, CISM, UMR CARTEL, 73376 Le Bourget du Lac, France

Received 12 November 2002; received in revised form 22 September 2003; accepted 26 September 2003

First published online 23 October 2003

## Abstract

We investigated the taxonomic composition of flagellate assemblages and taxon-specific bacterial grazing rates of heterotrophic and mixotrophic flagellates in the oligotrophic Lake Annecy (France). The comparison of bacterial grazing rates to bacterial production demonstrated a high transfer efficiency from the bacterial compartment up to flagellates. Per capita grazing rates ranged from  $1.2 \times 10^3$  to  $5.1 \times 10^6$  bacteria  $l^{-1} h^{-1}$  for heterotrophic flagellates, and from  $4.8 \times 10^6$  to  $6.8 \times 10^7$  bacteria  $l^{-1} h^{-1}$  for mixotrophic flagellates. The main bacterial grazers were *Katablepharis* within heterotrophic flagellates and *Dinobryon* within mixotrophic flagellates. Our results show that bacterial ingestion by a given flagellate taxon changed seasonally and could vary up to 30-fold. We also provide evidence that mixotrophic flagellates represent an important link in the flux of materials through planktonic food webs in Lake Annecy, suggesting that the introduction of mixotrophs within functional groups could improve our understanding of carbon flux pathways.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Heterotrophic nanoflagellate; Mixotrophic flagellate; Grazing rate; Lake Annecy; Microbial food web

## 1. Introduction

The recognition of the qualitative and quantitative importance of the microbial food web in freshwater ecosystems has greatly modified our approach to plankton ecology [1–3]. The ecological roles of heterotrophic flagellates and ciliates in freshwater pelagic environments were recently reviewed by Nakano [4], focusing especially on their roles as consumers of microbial plankton, food resources for zooplankton, and regenerators of inorganic nutrients. It is now well known that bacterivorous protists have the potentiality to regulate bacterial abundance and production and are therefore a keystone group in the transfer of picoplanktonic carbon to higher trophic levels [5–7]. However, although heterotrophic nanoflagellates (HNF) are generally recognised as the primary consumers of bacterioplankton and picoplankton in both marine and fresh-

water ecosystems [8–12], the number of records that show a lack of coupling between bacteria and HNF has increased in recent years [5,13,14]. Based on their investigation on bacterial grazing rates of heterotrophic flagellates, Cleven and Weisse [9] concluded that it seems obvious from the high variability of the data produced in the literature that we need to learn more about ingestion rates within a given flagellate population. Moreover, recent studies show the importance of mixotrophs as bacterial consumers [15–21], while their significance in regulating bacterial communities is still under discussion. Only a few studies have investigated seasonal succession and taxon-specific grazing rates of flagellates [2,9,10,22–24]. None of these studies were under strict oligotrophic conditions and mixotrophic species were rarely taken into account.

During this study, we investigated the taxonomic composition of flagellates and their bacterial consumption in the oligotrophic Lake Annecy. The goals were (i) to investigate the relative importance of different flagellate taxa (heterotrophic and mixotrophic flagellates) in bacterial regulation through grazing and (ii) to assess seasonal changes in taxon-specific bacterial uptake rates. We as-

\* Corresponding author.

E-mail address: isabelle.domaizon@univ-savoie.fr (I. Domaizon).



## Influence of zooplankton and phytoplankton on the fatty acid composition of digesta and tissue lipids of silver carp: mesocosm experiment

I. DOMAIZON\*, C. DESVILETTES, D. DEBROAS AND G. BOURDIER

Laboratoire de Biologie comparée des Protistes, UPRES A CNRS 6023, Université Blaise Pascal Clermont II, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France

(Received 21 December 1999, Accepted 25 March 2000)

Zooplankton appeared to be the major contributor to the diet of 1+ silver carp, whereas 3+ fishes exhibited a more evenly balanced spectrum between zooplankton and phytoplankton. The fatty acids profiles of digesta were influenced by zooplankton, particularly for 1+ silver carp. Together, fatty acid profiles of tank zooplankton and digesta were characterized by high proportion of 20:5 $\omega$ 3 and 20:6 $\omega$ 3. The fatty acids composition of the phytoplankton reflected the dominance of cyanobacteria and chlorophycea, with high quantities of 18:2 $\omega$ 6 and 18:3 $\omega$ 3. Although cyanobacteria accounted for >70% of the phytoplankton biomass ingested by the carp, fatty acids profiles of digesta were not influenced by phytoplankton fatty acids composition. The low digestive and conversion efficiency of *Microcystis aeruginosa* explain this absence of relation. The neutral lipids in silver carp tissues reflected poorly the fatty acids profiles in the diet, the semi-natural conditions and the diet dominated throughout the study by zooplankton, led to little variation in tissues fatty acids. The phospholipids in the muscle, liver and peri-intestinal fat were characterized by a rather low proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in both 1+ and 3+ fish. From a qualitative view point, cryptophycea, diatoms, and especially zooplankton are much more valuable food for the silver carp than cyanobacteria and desmid chlorophycea which are poor in long-chain PUFA.

© 2000 The Fisheries Society of the British Isles

Key words: silver carp; cyanobacteria; feeding behaviour; polyunsaturated fatty acids.

### INTRODUCTION

Recent studies have investigated the influence of pump filter feeding fish, particularly silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes), on plankton community structure and its potential use as a biomanipulation technique to reduce algal biomass (Leventer & Teltsch, 1990; Starling & Rocha, 1990; Starling, 1998). However, the use of silver carp to control excessive phytoplankton growth in eutrophic lacustrine ecosystems remains controversial (Costa-Pierce, 1992; Starling, 1993; Domaizon & Dévaux, 1999a). Several key factors could explain successes and failures of these biomanipulations: (1) the level of fish stocking biomass (Starling, 1998); (2) the size structure of the phytoplankton community (Laws & Weisburd, 1990); (3) the size structure of the zooplankton community and the strength of zooplankton grazing on dominant algae (Domaizon & Dévaux, 1996b) and (4) the efficiency by which phytoplankton are digested (Vörös *et al.*, 1997).

\*Author to whom correspondence should be addressed. Fax: 04 73 40 76 70; email: [Isabelle.DOMAIZON@lbp.univ-bpclermont.fr](mailto:Isabelle.DOMAIZON@lbp.univ-bpclermont.fr)

# Impact of moderate silver carp biomass gradient on zooplankton communities in a eutrophic reservoir. Consequences for the use of silver carp in biomanipulation

*Impact d'un gradient modéré de biomasses en carpe argentée sur le zooplancton d'un réservoir eutrophe. Conséquences pour l'utilisation de la carpe argentée dans les techniques de biomanipulation*

Isabelle Domaizon\*, Jean Dévaux

Laboratoire de biologie comparée des protistes, Upres A CNRS 6023, université Blaise-Pascal-Clermont-II, 24, avenue des Landais, Les Cézeaux, 63177 Aubière cedex, France

(Received 24 September 1998; accepted 15 March 1999)

Note communicated by Pierre Buser

**Abstract** — We examined the impacts of moderate gradient silver carp biomass (five levels from 0 to  $36 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ , i.e. about  $0\text{--}792 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) on zooplankton communities of the eutrophic Villerest reservoir (France). During our mesocosm experiment changes in zooplankton assemblages were dependent on silver carp biomass. In the fishless and low fish biomass treatments, zooplankton abundance increased through time, owing to a peak in cladoceran density, but decreased (mainly cladocerans) at highest fish biomass. Copepods and rotifers were less affected at the highest fish biomass and dominated zooplankton communities. We highlighted that the presence of high silver carp biomass could lead to changes in phytoplankton assemblage via the impact on herbivorous zooplankton. Since silver carp efficiently graze on particles  $> 20 \mu\text{m}$ , the suppression of herbivorous cladocerans could result in an increase in small size algae ( $< 20 \mu\text{m}$ ) abundance since these species would be released from grazers as well as competitors (large algae grazed by silver carp) and nutrients levels would be enhanced by fish internal loading. Our results showed that the use of low silver carp biomass ( $< 200 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) would allow us to minimize these negative effects. © Académie des Sciences / Elsevier, Paris

silver carp / biomanipulation / eutrophic reservoir / mesocosm / zooplankton

**Résumé** — Les effets de l'introduction d'un gradient modéré de biomasses de carpes argentées (cinq niveaux de 0 à  $36 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ ) sur les communautés zooplanctoniques du réservoir eutrophe de Villerest ont été examinées au cours d'une expérience en mésocosme. Nous observons un impact significatif de la biomasse de poissons sur l'abondance zooplanctonique. La présence des biomasses les plus élevées de carpes conduit à des changements dans la structure des communautés zooplanctoniques, affectant prioritairement les cladocères; tandis que les plus faibles biomasses de carpes sont associées à une augmentation de l'abondance zooplanctonique. Les copépodes et

\* Correspondence and reprints: domaizon@cicsun.univ-bpclermont.fr



## Experimental study of the impacts of silver carp on plankton communities of eutrophic Villerest reservoir (France)

Isabelle Domaizon and Jean Devaux

Laboratoire de Biologie Comparée des Protistes, UPRES-A CNRS 6023, Université Blaise Pascal Clermont II, 63177 Aubière Cedex, France (E-mail: domaizon@cicsun.univ-bpclermont.fr)

Accepted 6 April 1999

**Key words:** biomanipulation, eutrophic reservoir, mesocosm, phytoplankton, silver carp, zooplankton

### Abstract

We examined the impact of five silver carp biomass levels (0, 8, 16, 20, and 32 g m<sup>-3</sup>) on plankton communities and water quality of Villerest eutrophic reservoir (France). We realized the experiments using outdoor mesocosms. The presence of silver carp led to changes in zooplankton and phytoplankton assemblages. High fish biomass strongly reduced cladoceran abundance (through predation). Silver carp inefficiently grazed down particles < 20 μm. More importantly, however, the suppression of herbivorous cladocerans resulted in the increase of small size algae which were relieved from grazing and benefit from high nutrient concentrations.

In contrast, in mesocosms without fish, the dominance of cladocerans (mainly *Daphnia*) controlled small size algae and probably also larger size algae (colonial chlorophytes, cyanobacteria). Thus, the Secchi disc transparency increased markedly. Through cascade effects, the modification of grazers communities led to changes in the utilization patterns of the added nutrients by phytoplankton communities. In high fish biomass treatments, nutrients were more efficiently accumulated into particulate fractions compared with no-fish and low-fish biomass treatments that were characterized by higher dissolved nutrients concentrations. Zooplankton was an essential source of food for silver carp. The productivity of zooplankton sustained a moderate silver carp biomass (up to 16 g m<sup>-3</sup>). In the presence of the highest fish biomass, the productivity of zooplankton was not large enough and silver carps fed on additional phytoplankton. Although mesocosms with high fish biomass were characterized by a slight cyanobacteria development compared with other fish mesocosms, silver carp was not effective in reducing cyanobacteria dominance.

### Introduction

As confirmed by recent studies (Christoffersen et al., 1993; Vanni & Layne, 1997; Starling et al., in press), the cascading effects of fish on lower trophic levels continues to be a strong research focus in freshwater pelagic ecosystems. Of particular interest is the possible control of excessive phytoplankton through top down forces (Benndorf et al., 1984; Shapiro & Wright, 1984; Carpenter et al., 1985; Miura, 1990; Van Donk et al., 1990) i.e. biomanipulation (reviews in Benndorf, 1990 and Gophen, 1990). The classical view of top down control is the reduction of planktivorous fishes (through increased predation), which results in higher densities of herbivorous zooplankters

and consequently in lowered densities of algae due to zooplankton grazing. However, the ability of natural populations of zooplankton to control cyanobacterial blooms is still under discussion (see De Bernardi & Giussani, 1990). In the presence of a cyanobacterial bloom, the control of phytoplankton by zooplankton may not be effective (Bays & Crisman, 1983; Nilssen, 1984).

An alternative food web manipulation based on the direct control of undesirable net-phytoplankton by filter feeding phytoplanktivorous fish was investigated (Drenner et al., 1986; Starling, 1993). Several researchers have investigated the influence of pump filter feeding fishes, particularly silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), on plankton community