La boucle microbienne lacustre: l'exemple du lac du Bourget

Stéphan Jacquet

▶ **To cite this version:**

Stéphan Jacquet. La boucle microbienne lacustre: l'exemple du lac du Bourget. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Savoie, 2005. tel-02833049

HAL Id: tel-02833049
https://hal.inrae.fr/tel-02833049

Submitted on 7 Jun 2020

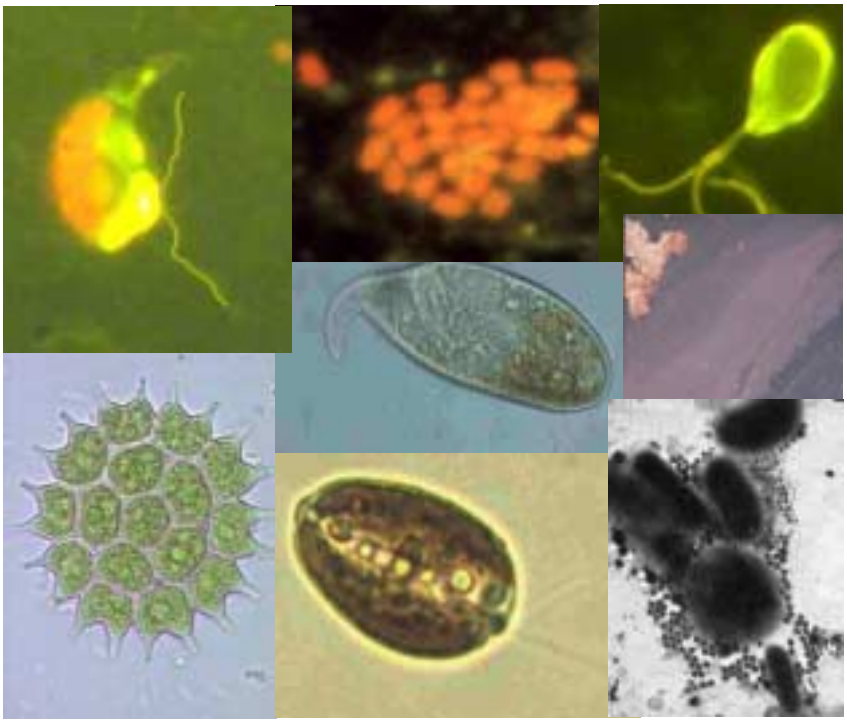
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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 à Diriger des Recherches
Université de Savoie

Dossier de candidature
2ème phase

Etude de la boucle microbienne lacustre : L'exemple du lac du Bourget



Stéphan JACQUET

Equipe de Microbiologie Aquatique / UMR (42) CARRTEL
INRA – Station d'Hydrobiologie Lacustre
75, avenue de Corzent – BP 511
74203 Thonon cx, France

Sommaire

Sommaire **2**

Préambule **4**
Les grandes étapes de l'HDR 4
Aspects généraux de l'HDR 5
Organisation du jury 6
Avis de soutenance et examen oral 7
Délivrance du diplôme 8

A – Activités d'animation, d'enseignement, d'encadrement et de transferts **10**
I. Animation scientifique **11**
I.1. Le projet ORE 11
I.2. L'organisation de réunions de travail 12
I.3. Les séminaires de la SHL 13
I.4. L'organisation d'un colloque européen à Thonon sous l'égide de l'ESF 14
I.5. Invitation à un workshop 16
II. Participation à l'activité collective **16**
II.1. Activités au sein de l'Equipe de Microbiologie Aquatique 16
II.2. Activités au sein de l'unité 19
II.3. Activités au delà de l'unité 20
II.4. Partenariats scientifiques 21
III. Activités d'enseignement et d'encadrement d'étudiants **23**
III.1. L'enseignement 23
III.2. L'encadrement des étudiants 24
IV. Transferts des connaissances **25**
V. Membres de jury, expertise, évaluateur **34**
VI. Contrats et projets **35**
VI.1. Demandeur/porteur 35
VI.2. Collaborateur 36

B – Activités de recherche – le modèle du lac du Bourget pour l'étude de la boucle microbienne **38**
I. Introduction générale **39**
I.1. Généralités sur la boucle microbienne 39
I.2. Le lac du Bourget : un terrain « modèle » 44
I.2.1. Caractéristiques générales du lac du Bourget et de son bassin versant 44
I.2.2. Qualité des eaux et biologie du lac du Bourget 46
I.2.3. Le lac et ses usages 50
I.2.4. Le projet grand lac : aménagement et développement du pays du lac du Bourget 51
I.2.5. Revue de la littérature 53
I.2.5.1. Revue sur les travaux ayant porté sur la biologie et le statut trophique du lac du Bourget. Cadrage. 53
I.2.5.2 Revue sur la boucle microbienne du lac du Bourget avant mes travaux 58

… / …

II. Résultats et premières conclusions de mes travaux concernant la boucle microbienne du lac du Bourget et de lacs voisins **62**
II.1. La dynamique et la diversité des communautés microbiennes 63
II.1.1. La dynamique des populations/communautés 63
II.1.2. La diversité des communautés 73
II.1.2.1. Les virus 73
II.1.2.2. Les bactéries 76
II.1.2.3. Les protozoaires 79
II.1.2.4. Le pico- et nanophytoplancton 80
II.1.3. Activité et production bactériennes 84
II.2. L'impact des virus et des protozoaires sur la mortalité des communautés bactériennes 86
II.3. Autres travaux : l'écologie des efflorescences cyanobactériennes 92

III. Perspectives **96**
III.1. Un projet innovant portant sur l'impact des UV sur la boucle microbienne du lac du Bourget 96
III.2. Les suites du premier congrès européen portant sur l'écologie des phages aquatiques 99
III.3. Un congrès autour du lac du Bourget en 2006 102
III.4. Deux nouvelles thèses 102
III.4.1. Dynamique et diversité du phytoplancton dans deux lacs-réservoirs du bassin de la Seine 102
III.4.2. Dynamique et diversité du pico- et nanophytoplancton lacustre 104
III.5 Un nouveau projet portant sur les virus de microalgues 104

IV. Synthèse des productions utilisées dans ce rapport depuis mon recrutement* **105**

* La liste des références bibliographiques utilisées dans ce rapport n'est pas donnée pour son allégement final. L'auteur peut néanmoins les fournir à la demande.

Préambule

Ce document fait suite à **l'avis favorable** donné par le conseil scientifique (5 octobre 2004) et la présidence de l'Université de Savoie (7 octobre 2004) sur le premier dossier dit d'inscription à l'Habilitation à Diriger des Recherches et qui a été expertisé par Messieurs Jean-Marcel DORIOZ (Directeur du Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques des Ecosystèmes Limniques) et Christian Amblard (Directeur du Laboratoire de Biologie des Protistes de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand 2). Ce premier dossier (joint à celui-ci) contenait les éléments suivants :

- un *curriculum vitae* résumé ;
- une synthèse des activités d'enseignement et d'encadrement d'étudiants ;
- une synthèse des activités de recherche et de leur valorisation ;
  une synthèse des responsabilités et activités d'animations ;
- un résumé des éléments permettant d'apprécier le rayonnement international ;
- une liste des publications de rang A et des autres travaux ;
- les noms, titres et fonctions des personnes ayant émis un avis sur cette candidature.

Dans ce second document dit dossier de candidature, et conformément aux indications données par l'Université de Savoie, il est fournit « *plusieurs ouvrages publiés ou dactylographiés, soit un dossier de travaux, accompagnés d'une synthèse de l'activité scientifique du candidat permettant de faire apparaître son expérience dans l'animation d'une recherche ».* **J'ai fait le choix de décomposer ce document en deux parties distinctes : la première permettant de considérer l'ensemble de mon activité au sein de mon équipe, de l'unité et au-delà et la seconde partie portant sur tous mes travaux de recherche sur le lac du Bourget : un écosystème modèle pour s'intéresser au fonctionnement de la boucle microbienne lacustre**.

Afin d'aider les membres du jury, il est donné (rappelé) ci-dessous les recommandations de l'Université de Savoie et les grandes étapes à respecter. Morceaux choisis.

Les grandes étapes de l'HDR

Dans l'année universitaire de la soutenance

- Préparation du dossier d'inscription.
- Inscription après avis favorable du Conseil Scientifique.
- Préparation du dossier de candidature.

 Retrait des imprimés « proposition de rapporteurs » et « proposition de jury » ainsi que le formulaire « résumé des travaux ».

Au moins dix semaines avant la soutenance

 Dépôt au Service des Etudes Doctorales d'une proposition des rapporteurs pour avis de la commission des thèses.

 Envoi du dossier de candidature aux rapporteurs après avis favorable.

Au moins cinq semaines avant la soutenance

 Dépôt au Service des Etudes Doctorales d'une proposition de jury pour avis de la commission des thèses.

 Envoi du dossier de candidature aux membres du jury.

Au moins quinze jours avant la soutenance

 Dépôt au Service des Etudes Doctorales du résumé des travaux en trente cinq exemplaires.

Après la soutenance

 Envoi du procès verbal de soutenance et du rapport de soutenance au Service des Etudes Doctorales dans le mois suivant la soutenance.

 Dépôt, au Service des Etudes Doctorales, d'un exemplaire du dossier de candidature pour transmission à la bibliothèque universitaire de l'Université de Savoie.

 Transmission à l'intéressé, par le Service des Etudes Doctorales, d'une attestation de réussite et d'une copie du procès verbal de soutenance et du rapport de soutenance.

Aspects généraux de l'HDR

L'habilitation à diriger des recherches n'a pas pour objet de sanctionner l'achèvement d'un cursus universitaire. C'est un diplôme national dont la délivrance permet la reconnaissance par les universités d'un niveau scientifique élevé caractérisé par :

- Une démarche **originale** dans un domaine scientifique ;
- La maîtrise d'une stratégie **autonome** de recherche scientifique ;
- La capacité à l'**encadrement** de jeunes chercheurs.

L'habilitation à diriger des recherches est un diplôme dont la finalité essentielle, sinon exclusive, est de permettre l'accès au corps des professeurs d'universités, conformément aux dispositions du décret portant statut du corps des professeurs d'universités et du corps des maîtres de conférences.

L'habilitation à diriger des recherches, de par sa conception, **n'est pas et ne doit en aucun cas être considérée comme un second doctorat**, de niveau supérieur, comme l'était auparavant le doctorat d'Etat par rapport au doctorat de troisième cycle.

Il s'agit d'une **procédure** qui doit, certes, être organisée de manière à garantir la haute qualité scientifique des candidats mais **qui doit rester légère**. On ne saurait, en particulier, exiger du candidat des conditions de délai pour leur inscription ou la préparation de l'habilitation dans l'établissement où celle-ci doit être présentée. On ne saurait non plus exiger du candidat la rédaction d'un véritable mémoire ni d'une seconde thèse, après celle du doctorat.

Le critère relatif à « la capacité à l'encadrement de jeunes chercheurs » peut être satisfait par la procédure de co-direction des thèses qui permet à un docteur non habilité, associé à un collègue habilité à diriger des recherches, l'encadrement de plusieurs thèses.

L'habilitation à diriger des recherches repose sur la prise en compte de la totalité de l'activité scientifique du candidat.

L'habilitation peut se préparer en dehors de la responsabilité d'un directeur de recherche.

Aucun délai de préparation n'est imposé.

Organisation du jury

Dossier de candidature

Le dossier de candidature comprend soit un ou plusieurs ouvrages publiés ou dactylographiés, soit un dossier de travaux, accompagnés d'une **synthèse de l'activité scientifique** du candidat permettant de faire apparaître son expérience dans l'animation d'une recherche.

Après avoir obtenu son autorisation d'inscription, le candidat prépare un dossier de candidature. Le dossier d'inscription peut servir pour la partie consacrée à la synthèse de l'activité scientifique.

Désignation des rapporteurs

Le président ou le directeur de l'établissement confie le soin d'examiner les travaux du candidat à au moins trois rapporteurs choisis en raison de leur compétence, dont deux au moins doivent être habilités à diriger des recherches. Deux de ces rapporteurs doivent ne pas appartenir au corps enseignant de l'établissement dans lequel le candidat a déposé sa demande.

Les personnalités consultées font connaître leur avis par des rapports écrits et motivés, sur la base desquels peut être autorisée la présentation orale des travaux du candidat devant le jury. Ces rapports sont communiqués au candidat et peuvent être consultés par toute personne habilitée à diriger des recherches.

Les démarches sont à entreprendre au minimum dix semaines avant la présentation orale des travaux. Le candidat, le cas échéant après avis de son directeur de recherche, propose trois rapporteurs pour avis de la Commission des Thèses.

Le candidat envoie à chaque rapporteur un exemplaire de son dossier de candidature. Les rapporteurs fournissent au moins trois semaines avant la soutenance, les rapports écrits sur la base desquels le Président de l'Université autorise la soutenance.

Désignation du jury

Le jury est nommé par le président ou le directeur de l'établissement.

Il est composé d'au moins cinq membres choisis parmi les personnels enseignants habilités à diriger des recherches des établissements d'enseignement supérieur public, les directeurs et maîtres de recherche des établissements publics à caractère scientifique et technologique et, pour au moins de la moitié, de personnalités françaises ou étrangères extérieures à l'établissement et reconnues en raison de leur compétence scientifique.

La moitié du jury, au moins, doit être composée de professeurs ou assimilés au sens de l'article premier de l'arrêté du 19 février 1987 susvisé.

Au moins cinq semaines avant la soutenance, le candidat dépose l'imprimé « proposition de jury » et la date de soutenance pour avis de la Commission des Thèses.

Le jury doit refléter la complémentarité des disciplines concernées par les travaux du candidat. Dans la mesure du possible, il comprend :

- les rapporteurs,
- une ou deux personnalités de l'Université de Savoie habilitées à diriger des recherches,
- une ou plusieurs personnalités françaises ou étrangères retenues en raison de leur compétence scientifique.

Le candidat adresse un exemplaire de son dossier de candidature à chaque membre du jury.

Le Service des Etudes Doctorales transmet une copie des rapports établis sur les travaux à chaque membre du jury et au candidat.

Avis de soutenance et examen oral

Un résumé des ouvrages ou des travaux est diffusé à l'intérieur de l'établissement.

L'avis de présentation des travaux est affiché dans l'enceinte de l'établissement.

Le président ou le directeur de l'établissement prend les mesures appropriées pour assurer hors de l'établissement la diffusion de l'information relative à la présentation des travaux, notamment auprès des autres universités et établissements délivrant, l'habilitation à diriger des recherches et auprès du Conseil National des Universités.

Le candidat dépose au moins quinze jours avant la soutenance, au Service des Etudes Doctorales trente cinq exemplaires du résumé de ses travaux.

La diffusion de cette information est réalisée par le Service des Etudes Doctorales avant la présentation orale.

Le jury désigne en son sein un président et deux rapporteurs ; ces derniers doivent être extérieurs à l'établissement.

La présentation des travaux est publique. Toutefois, si l'objet des travaux l'exige, le président ou le directeur de l'établissement peut prendre toute disposition utile pour en protéger le caractère confidentiel.

Le candidat fait devant le jury un exposé sur l'ensemble de ses travaux, et éventuellement, pour une partie d'entre eux, une démonstration. Cet exposé donne lieu à une discussion avec le jury ».

Délivrance du diplôme

Le jury procède à un examen de la valeur du candidat, évalue sa capacité à concevoir, diriger, animer et coordonner des activités de recherche et de valorisation, et statue sur la délivrance de l'habilitation.

Le Président du jury, après avoir recueilli l'avis des membres du jury, établit un rapport. Ce rapport est contresigné par l'ensemble des membres du jury et communiqué au candidat. Il peut être consulté par toute personne habilitée à diriger des recherches.

Le procès verbal de soutenance et le rapport de soutenance doivent être retournés, au plus tard un mois après la soutenance, au Service des Etudes Doctorales par le Président du jury. Un exemplaire final du dossier de candidature sera déposé au Service des Etudes Doctorales pour transmission à la bibliothèque universitaire de l'Université de Savoie où il pourra être consulté sur place ou communiqué par le prêt entre bibliothèques. Une attestation de réussite et une copie du procès verbal de soutenance et du rapport de soutenance seront alors transmises au candidat.

La proposition des membres du jury est donnée ci-après :

Le jury proposé par le candidat pour statuer de cette demande d'habilitation est composé comme suit :

Nom	Prénom	Statut	Etablissement	HDR et/ou Professeur	Rapporteur
FONTVIEILLE	Dominique	Professeur	Université de Savoie, Bourget-du-lac	Oui	**Oui**
AMBLARD	Christian	Directeur de Recherche	CNRS, Université de Clermont-Ferrand 2	Oui	**Oui**
MONTUELLE	Bernard	Directeur de Recherche	CEMAGREF, Lyon	Oui	**Oui**
DORIOZ	Jean Marcel	Directeur de Recherche	INRA, Station d'Hydrobiologie Lacustre, Thonon	Oui	Non
GESSNER	Mark	Professeur	EAWAG, Limnological Research Center Kastanienbaum	Oui	Non
BOUVY	Marc	Directeur de Recherche	Centre IRD Bel Air, BP 1386, Dakar	Oui	Non
BERTRAND	Jean-Claude	Professeur	Laboratoire de Microbiologie Géochimie et Ecologies Marines Université d'Aix-Marseille 2	Oui	Non

Je tiens à remercier Isabelle DOMAIZON (Maître de Conférences à l'Université de Savoie) et Rémy TADONLEKE (Chargé de Recherche à l'INRA de Thonon-les-Bains) pour leur relecture critique de ce document avant son envoi aux membres du jury.

PARTIE A

Activités d'animation, d'enseignement, d'encadrement, et de transfert

I. Animation scientifique

I.1. Le projet ORE

A l'initiative du directeur de l'unité (Jean-Marcel DORIOZ), la Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre de Thonon-les-Bains a proposé à la Direction Scientifique de l'INRA de mettre en place un Observatoire de Recherche en Environnement portant sur les grands lacs subalpins (**ORE Lacs subalpins**). Ce projet, visant à décrire la structure, le fonctionnement et l'évolution écologique des grands lacs subalpins (Annecy, Bourget, Léman) sous influence anthropique a surtout été porté et animé par 3 personnes au sein de l'unité : Jean-Marcel DORIOZ, Orlanne ANNEVILLE et moi-même. Pour ce projet, je suis intervenu à plusieurs niveaux :

- le partenariat en prenant contact avec différents chercheurs comme par exemple Thierry CAQUET (responsable de l'ORE Risques, écotoxicologie et durabilité des écosystèmes), Alexandre BECK et Marc DESMET (de l'Université de Savoie qui travaillent dans le domaine de la paléolimnologie), etc ;
- le travail d'écriture effectué notamment le dernier semestre 2003 afin de répondre à l'appel d'offre de 2004. Je me suis occupé également de la lettre de demande de partenariat et de relance auprès de François HOUILLIER (ancien chef du département EFPA), spécifiant le degré d'avancement et l'échéancier 2004 ;
- l'animation avec la mise en place de la première réunion de travail sur le document initial avec tous les partenaires (écriture des lettres d'invitation, renseignements pour les ordres de mission, récupération de tous les diaporamas de présentation de tous les partenaires, etc). J'ai au cours de cette réunion joué le rôle de secrétaire de la séance pour écrire et restituer son compte-rendu ;
- créateur et webmaster de la page INTERNET de notre ORE. A l'origine, cette page était rattaché à mon site personnel (initiative personnelle après accord de ma direction): (http://jacquet.stephan.free.fr/ORE.htm) puis elle a migré à la fin de l'année 2004 sur le site de l'unité (http://www.thonon.inra.fr/ORE/ORE.htm). J'y mets à disposition tous les documents se rapportant aux ORE pour que nos partenaires aient la possibilité de connaître les dernières informations sur ce sujet. On trouve aussi sur cette page les adresses des partenaires, des publications en ligne, etc.

En 2005, notre comité de pilotage s'est agrandi avec Ghisliane MONET, responsable du service informatique et des bases de données de l'unité. Nous nous réunissons régulièrement pour structurer au mieux les besoins et les attentes autour de ce grand projet. Une nouvelle réunion avec l'ensemble des partenaires sera organisée en septembre ou octobre 2005.

I.2. L'organisation de réunions de travail

Je suis très souvent à l'origine de **réunions de travail au sein de notre équipe** mais aussi avec des partenaires scientifiques extérieurs. C'est le cas par exemple avec nos collègues chambériens pour la présentation et l'exploitation de résultats communs. Depuis le début de ma collaboration privilégiée avec Isabelle DOMAIZON (maître de conférence à l'Université de Savoie), nous avons co-encadré plusieurs DEA (ou MASTER) et une thèse, publiés, soumis ou préparés 6 publications scientifiques de rang A, présenté des posters et communications orales dans des congrès nationaux et internationaux.

Toutes les semaines, j'organise des réunions avec un ou plusieurs de **mes étudiants** (voir plus bas).

Depuis 2005, je m'occupe avec Agnès BOUCHEZ de **l'animation de l'Equipe de Microbiologie Aquatique** en raison de l'absence de plus en plus marquée de Jean-François HUMBERT (ancien animateur) et son départ imminent de l'unité. Il a été décidé au début de l'année 2005 qu'Agnès BOUCHEZ serait la nouvelle animatrice de notre groupe et je tiens à dire qu'elle joue parfaitement son rôle. Ensemble, nous organisons les réunions d'équipe sur une base mensuelle pour faire le point des recherches en cours et des projets à venir. Nous avons décidé de donner la possibilité à nos étudiants de présenter en quelques diapositives leur travail et de discuter autour de ce support, etc. A la demande du directeur de l'unité (Jean-Marcel DORIOZ), je m'occupe au sein du groupe de l'aspect « relations humaines » et organise souvent des mini-réunions avec les personnes concernées.

En 2004 et 2005, nous avons été associé dans le cadre d'un **projet ECCO** à l'Université de Paris 7 pour travailler sur la dynamique lacustre et l'hétérogénéité biogéochimique aux interfaces sur le lac du Bourget (programme DYLACHEM). Dans le cadre de ce projet détaillé plus bas, je suis le responsable pour l'équipe de tout ce qui s'y rapporte de près ou de loin. Dans ce cadre, je me suis donc occupé des réunions préparatoires, de la conception et de l'écriture de notre projet/implication mais aussi de toute la logistique inhérente aux deux missions qui ont déjà eu lieu en juin et décembre 2004 (personnels impliqués, petit et gros matériel, bateaux, hôtels, restauration, etc).

Début 2005, le département EFPA de l'INRA a soutenu mon **projet innovant** portant sur l'impact des ultraviolets sur la structure et le fonctionnement de la boucle microbienne lacustre. J'ai

organisé deux réunions de préparation et de synthèse pour la mise en place du projet avec l'ensemble des personnels concernés (10 personnes) aux mois de mai et juin (voir plus bas).

En 2005, le départ de Raymonde CHANDEVAULT préposée à la **laverie** de notre équipe m'a poussé à organiser une réunion de travail pour l'ensemble du groupe afin d'assurer le transfert de connaissances. 8 personnes y ont assisté. Un compte-rendu qui entre dans le cadre de la démarche qualité a été publié et a été mis en ligne sur l'intranet de la Station. Cette réunion a aussi permis de mettre en lumière la nécessité d'une formation « autoclave » dont je me suis occupé (voir plus bas).

En 2005, la mise en place de la **thèse** d'Anne ROLLAND dont je suis l'instigateur et responsable direct a nécessité l'organisation de réunions avec les partenaires financiers (IIBRBS et GREBE). Cela a permis de clarifier un certain nombre de points scientifiques et administratifs pour le démarrage de cette thèse au mois de juillet (voir plus bas).

Dans le cadre de la thèse de Sébastien PERSONNIC, **un comité de thèse** a été formé à l'origine à mon initiative et une réunion à mi- parcours a eu lieu en mai 2005 en conviant l'ensemble des membres de ce comité à venir discuter du projet, des résultats acquis et de son avancement.

I.3. Les séminaires de la SHL

Depuis janvier 2002, la Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre (SHL) de Thonon s'est enrichie d'une véritable animation scientifique intitulée « les séminaires de la SHL » mise en place après que j'ai rencontrée et discutée avec l'ensemble du personnel de l'unité. L'enquête (réalisée en décembre 2001) m'avait permis de « prendre la température » et d'exposer l'idée de mettre en place une session de séminaires au sein de la station, ayant un caractère informel ou informatif, mais néanmoins préparé et scientifiquement rigoureux, réservée à tous, sur une base mensuelle. L'idée sous-jacente était de mieux se connaître et faire part de notre savoir, de notre travail. Notre unité propose donc depuis 2002 cette animation scientifique. Elle consiste pour des chercheurs/ingénieurs/étudiants locaux ou invités à présenter un exposé scientifique d'une trentaine de minutes. Les exposés se veulent didactiques et à portée de tous avec la rigueur scientifique qui s'impose. J'en suis donc **l'instigateur et animateur**. Je m'occupe entre autre de trouver les conférenciers internes à l'unité ou venant de l'extérieur (obligatoire pour assurer le « turn-over » et continuer à susciter l'intérêt et l'engouement de tous). Un affichage sur le site web de la Station a été fait et les exposés passées sont consultables en ligne à l'adresse suivante : http://www.thonon.inra.fr/seminaires/seminaire-frame.htm. Le calendrier prévisionnel pour l'année

en cours est également en ligne. J'assure la communication interne et externe. Cette aventure continue et se porte donc extrêmement bien. Néanmoins, après 3 ans de loyaux services, je vais passer la main (au cours de l'été 2005) à mon collègue Rémy Tadonléké, pour m'investir dans d'autres taches et parce que je suis partisan du renouvellement des responsabilités et donc des idées.

I.4. L'organisation d'un colloque européen à Thonon sous l'égide de l'ESF

Parce que les collaborations internationales sont indispensables pour l'intérêt et la nécessité de contribuer à l'avancée générale des connaissances, parce que l'écologie virale aquatique débute en France, parce que le milieu lacustre accuse d'un certain retard dans ce domaine comparativement à la communauté océanographique, j'ai répondu à l'appel d'offre de l'ESF (*European Science Fundation*) de demande de subventions pour la réalisation d'un atelier de travail européen (qui a eu lieu en février 2005 à Thonon-les-Bains) afin d'explorer les résultats passés, présents et ce que devra être l'avenir sur cette thématique qu'est l'écologie des phages en milieu aquatique, avec l'ensemble des chercheurs européens travaillant dans ce domaine. L'idée était, *in fine,* de mettre en place un réseau d'excellence de la recherche européenne dans les prochaines années. 50 personnes ont répondu à cet appel. Voici une partie du résumé du projet déposé auprès de l'EFS:

> *The aims of this ESF Exploratory Workshop will be to target and explore this challenging scientific topic, which would greatly benefit from a collaborative European approach to foster transnational and interdisciplinary links as well as to develop future collaborative research project and programmes. This workshop will focus on virus-bacterial and virus-cyanobacterial interactions in aquatic systems, and how these interactions affect the structure and functioning of microbial food webs and their participation in important biogeochemical processes such as the carbon cycle, as well as viral diversity. I propose this workshop to be the first of future ones, and so am referring to it as the* ***1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology (EWAPE-1)****. All scientists proposed below in the table list have been contacted. They all encouraged this initiative and will participate to this important event. It is noteworthy that a significant effort has been made by the applicant for the participation of young researchers and female scientists.*

Ce travail a consisté pour moi à tout organiser, à savoir :

- la rédaction de la déclaration d'intention auprès de l'ESF et des différents chercheurs européens ;
- la recherche de fonds de façon à ce que les congressistes n'aient rien à payer sauf leur voyage (j'ai obtenu 25 000 Euros au total*) ;
- la création d'un site INTERNET ;
- l'animation de ce projet ;
- l'accueil des participants ;
- la logistique (hôtellerie, restauration, location du château de Ripaille, installation, etc)

Tout est résumé et peut être conceptualisé en visitant le site INTERNET dédié à cet événement exceptionnel : http://www.inra.thonon.fr/EWAPE1/index.htm toujours d'actualité et actualisé souvent en fonction des retombées de ce colloque.

Ce travail a duré plusieurs mois. Il a été long et fastidieux. Il a aussi été passionnant et m'a permis de réaliser ce pour quoi j'ai le sentiment d'être fait : animer. Et puis :

Si tu veux faire quelque chose ou tu trouves les moyens ou tu trouves des excuses

Pinda

Les résultats et retombées du workshop peuvent être résumés comme suit :

- 45 participants représentant 14 nationalités ont pu assister à 25 présentations orales et lire 18 posters pendant 2,5 jours dans le cadre somptueux du Château de Ripaille (Thonon-les-Bains) ;
- *Freshwater Biology* m'a demandé d'être l'éditeur d'une issue spécial portant sur l'écologie des phages en milieu aquatique. J'avais accepté l'idée à l'origine et m'étais entouré d'un comité scientifique. Toutefois, la communauté étant faite de biologistes marins et dulçaquicoles, il n'a pas paru que cette revue soit la plus adaptée. L'éditeur en chef de *Aquatic Microbial Ecology* a accepté l'édition d'une revue spéciale et c'est dans ce journal que nous publierons;
- Le colloque a été un énorme succès scientifique et humain. Ma proposition que la communauté européenne puisse organiser ce type d'événement tous les 3 ou 4 ans a été largement acceptée. Cette proposition a été débattue lors du dernier congrès sur les virus de microalgues (*Algal Virus Workshop* 4) qui s'est tenu à Amsterdam (Hollande) pour associer les deux communautés : celle des « écophagistes » et celle des « algovirologues » à l'échelon européen. Les personnes en charge de ce Workshop m'ont d'ores et déjà assuré de leur soutien et c'est donc ce que nous proposerons dans les années à venir ;
- Suite au colloque, les 5 ou 6 équipes françaises travaillant sur l'écologie des virus de microorganismes aquatiques va se fédérer. Cela a commencé par une réunion avec les membres du GDR 2476 (Réseaux trophiques pélagiques) animé par Bezhad MOSTAJIR de l'Université de Montpellier à laquelle j'ai donc été invité en mai 2005 (voir ci-dessous). Au-delà, il est question de créer un réseau européen qui permettra de faciliter les échanges et les transferts de technologie, de méthodologie, les voyages pour étudiants, les contrats, etc. Cette proposition a aussi trouvé une très large approbation ;

- le site INTERNET continue de vivre et les présentations (posters et communications orales) sont en ligne mais disponibles uniquement si l'on a le mot de passe !
-

*Le colloque a été financé à hauteur de 25 000 Euros par l'Europe (*European Science Fundation*, 14 000 Euros), l'Université de Savoie (3 000 Euros), l'INRA (3 000 Euros dont 1 500 du département EFPA), le conseil général de Haute-Savoie (1 500 Euros), le conseil régional de Rhône-Alpes (1 000 Euros), *Véolia Environnement* (1 000 Euros) et la ville de Thonon-les-Bains (1 500 Euros équivalent).

I.5. Invitation à un workshop

J'ai été invité par le Dr Cristiana CALLIERI à son *Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms* qui s'est déroulé à Pallanza (Italie) du 6 au 8 octobre 2004. J'y ai été **animateur d'une session** (chairmam) portant sur le contrôle biologique des microorganismes et nous avons présenté 3 communications orales pendant ces 3 journées (voir plus bas). Plus d'informations sont disponibles à l'adresse suivante : http://www.iii.to.cnr.it/ecolmicro/ où j'ai également posté des photos de l'événement.

II. Participation à l'activité collective

II.1. Activités au sein de l'Equipe de Microbiologie Aquatique

Je pense qu'une bonne partie du chapitre précédent pourrait trouver sa place dans cette rubrique à commencer par ma participation active pour l'animation de notre équipe. Depuis 2003, je suis **le responsable du volet portant sur la boucle microbienne**, notamment avec l'émergence de deux nouvelles thématiques de recherche à Thonon : l'écologie des virus et l'écologie du pico- et nanophytoplancton lacustre (voir plus bas). Ces thématiques fonctionnement au travers de l'accueil et l'encadrement d'étudiants de niveau minimum Bac+5 chaque année. Pour cela, je propose des sujets de recherche aux écoles doctorales d'intérêt et ces sujets sont également mis en ligne sur le site INTERNET de l'Unité et aussi sur mon site personnel. L'aide et l'encadrement des étudiants m'occupent beaucoup mais je mets un point d'honneur à être irréprochable sur cet aspect (voir plus bas).

J'ai fait réaliser une **base de données pour l'algothèque** de Thonon sous la forme d'une interface dynamique pour la gestion et le référencement des algues répertoriées à la Station INRA de Thonon. Ce travail a été confié à deux étudiants, Romain BIGO et Romain JOSSERAND, de

l'IUT Génie des télécommunications et réseaux d'Annecy, dans le cadre d'un travail pratique que ces élèves sont amenés à réaliser en seconde année. Je tiens à souligner ici que ce travail a été suivi de près par Ghsilaine MONET, la personne en charge de l'informatique à la Station qui m'a fortement aidé. Un document de synthèse a aussi été élaboré et nous allons prochainement documenté et testé la base de données. Je pense que cette initiative sera très pertinente quand on sait que le nombre de souchothèques est peu nombreuse à l'échelon national et que l'Europe m'a récemment contacté pour que notre algothèque soit référencé dans leur base de données. Le contact est Rachel Saxon, administrateur de la *European Culture Collection of Algae and Protozoa* (ALGINET), dont tous les renseignements sont disponibles à : http://www.search-labs.com/Alginet/database1.html

Je m'occupe souvent des **commandes** pour mes étudiants et les techniciens du groupe qui viennent me le demander. Cela concerne aussi tout ce qui est associé à mes projets de recherche et il est des matériels difficiles à trouver parfois !

Le départ à la retraite de la personne en charge de la laverie m'a alerté sur l'habilitation obligatoire (on le croyait) à obtenir pour utiliser le système à pression de vapeur à couvercle amovible de la laverie de l'équipe. J'ai donc fait organiser via la formation permanente un **stage d'information/formation/manipulation** des systèmes autoclave où 7 personnes ont participé. L'objectif était de prendre conscience des dangers liés à l'utilisation de la vapeur d'eau sous pression pour assurer la sécurité des personnels et des matériels, satisfaire à l'obligation réglementaire, responsabiliser les agents de conduite. Le stage a mis en lumière le danger de ces systèmes mais surtout qu'il n' y a pas besoin d'habilitation pour les systèmes que l'on utilise. Il est néanmoins obligatoire que les personnes soient officiellement formé à l'utilisation de ce type d'appareil.

J'ai pris l'initiative de faire le point et de mettre en ligne toutes **les publications des membres de l'équipe** passés ou actuels (depuis 1999) et la plupart de ces articles peut être téléchargée sous la forme d'un fichier PDF (http://jacquet.stephan.free.fr/Publications_groupe.htm). Cette page est actualisée à chaque fois que c'est nécessaire. Plus de 60 publications ont ainsi été référencées à ce jour.

A la demande de mon directeur d'unité, j'ai écrit les demandes d'intention **de recrutement** pour un poste CR1 affiché 'bactérioplancton', un poste IE affiché 'taxonomie du phytoplancton' et un poste TR 'Microbiologie' (mars & avril 2005). En voici les résumés originaux ci-dessous :

Profil bactérioplancton (pour un Chargé de Recherche 1ère classe)
Les bactéries hétérotrophes et autotrophes occupent une position clef au sein du réseau trophique pélagique, non seulement comme source de nourriture pour les protozoaires flagellés et ciliés, mais également comme agents de re-minéralisation de la matière organique pour les premières et contributeurs à la production primaire de l'écosystème pour les secondes. La dynamique et la diversité structurelle et fonctionnelle de ces procaryotes dans les lacs périalpins sont très peu connues à ce jour. Le candidat recruté aura en charge le développement des études concernant (1) les interactions entre ces communautés bactériennes et leur environnement abiotique et biotique au moyen des techniques de Biologie moléculaire, (2) les relations entre structure et fonctionnement de ces communautés et de l'écosystème (3) l'utilisation potentielle de certaines populations comme bio-indicatrices des changements d'état locaux (changement d'état trophique, pollution par les xénobiotiques) et plus globaux (réchauffement climatique, accroissement de l'impact des UV dans les eaux de surface). Il sera donc spécialiste du bactérioplancton et ses compétences en écologie bactérienne et en biologie moléculaire permettront de renforcer les deux principales thématiques de l'équipe d'accueil : le fonctionnement de la boucle microbienne et l'écotoxicologie en dynamique des communautés et en écophysiologie.

Profil taxonomie du phytoplancton (pour un Ingénieur d'Etude)
Le phytoplancton occupe une position clef à la base du réseau trophique pélagique comme source de nourriture pour les maillons trophiques supérieurs. Il est généralement un excellent indicateur des changements locaux (eutrophisation ou autre type de pollution) et plus globaux (réchauffement climatique, accroissement des UV et impacts dans les eaux de surface) dans les écosystèmes lentiques et lotiques. Près d'un millier d'espèces sont caractéristiques des lacs péri-alplins et d'altitude mais aussi des rivières alentours. Le candidat recruté devra être capable d'identifier les différentes microalgues et sera amené à faire le lien entre la taxinomie classique (reconnaissance et dénombrement en microscopie) et les moyens plus modernes d'identification (chromatographie, biologie moléculaire, microscopie électronique à balayage) ou de surveillance (sondes fluorimètriques). Il sera impliqué dans les différentes thématiques de recherche de l'équipe d'accueil, notamment en écotoxicologie. Il participera à l'effort de mise à jour de l'algothèque de la Station d'Hydrobiologie Lacustre de Thonon.

Profil Microbiologie (pour un Technicien de Recherche)
L'étude de la dynamique, de la diversité et du rôle fonctionnel des microorganismes en milieu aquatique est devenu en quelques années une spécialité de l'Unité CARRTEL à Thonon et ce, en réponse à une demande croissante à combler l'énorme lacune existante dans ce domaine. Le parc instrumental à disposition (Cytométrie en flux, Microscopie à épifluorescence, Culture sur boites, Laboratoire de Biologie Moléculaire, etc) nécessite aujourd'hui le recrutement d'une personne pour faire l'ensemble des analyses nécessaires aux équipes de recherches EMA (Equipe de Microbiologie Aquatique) et BV (Bassin Versant). La personne recrutée devra avoir une formation dans le domaine de la Microbiologie.

J'ai aidé à la construction du dossier de **demande de délégation** d'Isabelle DOMAIZON (mars 2005), qui a été accepté par l'INRA en mai.

En mars 2005, les **membres du GDR 2476** (Réseaux Trophiques Pélagiques) m'ont demandé si j'acceptais de voir notre équipe s'ajouter à ce groupement et cela est une retombée directe de mon workshop. J'ai accepté après concertation des membres de mon équipe et du directeur d'unité et nous avons déjà pu acquérir des fonds via ce GDR. J'ai participé à une réunion en mai à Montpellier où j'ai présenté notre équipe et les projets en cours et à venir en adéquation avec les

thématiques du GDR. C'est au cours de cette réunion qu'est né le **réseau français d'écologie virale aquatique**, hébergé par le GDR.

En avril 2005, j'ai pris l'initiative d'un **grand nettoyage de printemps du laboratoire,** ce que je n'avais jamais vu faire dans l'équipe auparavant. Le volume dégagé a été impressionnant et de nombreux placards, armoires, étagère et dessous de paillasses ont retrouvé une vie normale.

II.2. Activités au sein de l'unité

Là encore, je pourrais renvoyer en partie sur les chapitres précédents pour mettre en avant mon implication directe ou indirecte dans la vie de l'unité au service de la collectivité. Ci-dessous, je développe des points nouveaux par rapport à ce qui a pu déjà être lu au dessus (à savoir le projet **ORE** et l'**organisation des séminaires**).

J'appartiens à **deux groupes de travail intitulés BADEL et INTENET**. Le premier vise à réfléchir et mettre en œuvre ce qu'il faut pour la création d'une base de données lacustres. Ce groupe d'animation se rencontre régulièrement à la demande de Jean GUILLARD (Directeur adjoint de l'unité) pour faire le point sur le degré d'avancement de restitution et mise en forme des données, des audits faits auprès du personnel scientifique sur la base elle-même, du partenariat avec MEDIAS France, responsable de la mise en place des bases de données INRA, etc. La réflexion portant sur la construction de cette base est extrêmement importante et elle est aussi très compliquée tant notre laboratoire i) dispose d'une richesse en données exceptionnelle ; ii) présente des enregistrements très différents de ces données. Je me suis occupé pour mon équipe de faire le point sur les futurs champs à remplir dans cette base, séparer ce qui relevait de la notion de données et/ou de métadonnées, etc. Je suis le représentant pour mon équipe au sein du second groupe de travail intitulé INTERNET ou Web qui a pour objectif de transformer et faire évoluer le site INTERNET de l'unité. Dans ce cadre, j'ai pu faire un certain nombre de propositions comme celles d'optimisation de son utilisation avec la mise à disposition de sujets en ligne, la mise en ligne d'une page séminaire avec la possibilité de lire le diaporama de l'intervenant, des interfaces dans différentes langues (l'anglais surtout). J'ai fait faire aux différents chercheurs et ingénieurs de l'équipe un résumé de leurs activités afin que ce dernier puisse être traduit en anglais et mis sur le site de l'unité fin 2004.

Je participe toujours aux **conseils de gestion et scientifiques** de l'unité quand je suis là. J'y interviens si j'ai des choses à demander, proposer ou dire.

A plusieurs occasions, j'ai pu jouer le rôle de **« porte-parole » de l'équipe** lors de grandes réunions organisées par l'unité. Les deux dernières en date (février et mars 2005) ont été : i) celle proposée par Jean-Marcel DORIOZ (Directeur de l'unité) à l'Institut FOREL (Institut de recherche et d'enseignement Suisse associé à l'Université de Genève et travaillant comme nous sur le Lac Léman) ; ii) celle avec la DRED (Division Recherche de l'Ecole Doctoral de l'Université de Savoie). J'ai donc présenté notre équipe (thèmes de recherche, projets, moyens humains et matériels, collaborations, etc) et je n'en ai eu que des échos très favorables. En amont de ces réunions, ce diaporama a toujours été présenté à l'équipe quelques jours auparavant pour que tout le monde soit au courant et que l'on soit d'accord sur sa forme et sur le fond. Il est consultable sur le site INTERNET de la Station ou sur mon site personnel.

J'ai proposé par le passé l'écriture d'un **article de synthèse** sur toutes les données portant sur le lac Léman (article pouvant donner lieu à une publication dans une revue de type *Nature* et où tout le personnel de la Station serait impliqué). L'idée était que sur la base d'une première observation rapide de près de 40 ans de données, le lac Léman apparaît comme un écosystème difficilement prédictible mais aussi que de grandes tendances évolutives liée au contexte local (pollution nutritive et restauration) et plus global (réchauffement climatique) peuvent être déclinées sur l'ensemble des paramètres physiques, chimiques et biologiques. A cela s'ajoutait l'idée de voir l'impact du réchauffement climatique, le tout constituant une excellente base de travail dans le cadre du projet ORE. Pour le moment, ce projet est un peu en *stand-by* pour des raisons évidentes de temps.

Quelques mois après mon arrivée à Thonon, j'ai eu la chance de pouvoir faire une demande de moyens lourds auprès de l'INRA et de l'Université de Savoie, qui a été accepté pour l'achat d'un **cytomètre en flux**. Aujourd'hui cet appareil fonctionne en routine au sein de l'Equipe mais trouve de nombreuses applications au sein de l'unité et au-delà (voir plus bas). A la fin de l'année 2004, j'ai pu augmenter la sensibilité de l'appareil au moyen de l'acquisition d'une seconde source LASER.

Depuis 2003, je suis le **responsable scientifique des prélèvements** opérés sur le lac du Bourget.

II.3. Activités au delà de l'unité

Je suis formateur, instructeur et membre du jury de la formation à l'habilitation à la qualification de chef de **plongée scientifique** du CNRS chaque année. Cette fonction se traduit par la participation à des réunions préparatoires, la préparation de nombreux cours et documents, et 15 jours sur le terrain généralement au mois de septembre. Cette activité de plongeurs scientifiques trouve d'autres implications et applications :

- j'ai déposé à deux reprises un dossier sur la plongée scientifique à l'INRA pour faire reconnaître cette activité par l'Institut. Il n'a jamais été accepté et pourtant la plongée est utilisée à l'INRA. Il est vrai que cette activité est marginale.
- j'ai été second Chef de mission sur la plongée DYLACHEM sur le lac du Bourget en juin 2004 ;
- j'ai participé à la recherche d'objets perdus à la sortie du port de l'INRA ;
- je suis le relais entre certaines attentes de chercheurs de l'INRA et des clubs de plongée locaux ;
- un stand INRA (thème : du prélèvement en plongée à l'observation) a été mis en place dans le cadre de la fête du nautisme organisé à Thonon-les-Bains au mois de mai 2005.

Au mois de mai 2005, Isabelle DOMAIZON et Jérôme POUELNARD (maîtres de conférences à l'Université de Savoie) m'ont demandé d'être **membre extérieur de la commission de spécialistes des sections 64 à 68 de l'Université de Savoie**. J'ai accepté.

II.4. Partenariats scientifiques

Ce thème a toujours été au cœur des préoccupations de l'INRA qui s'est interrogé rapidement sur la nature, la place et le rôle de la recherche dans la société. Il sous-entend la création pour le chercheur, son équipe, son unité de liens plus adaptés et plus étroits avec certains des acteurs avec lesquels il travaille. Il peut être résumé par la règle des 4 c : consultation, concertation, coordination et coopération. Au niveau de la recherche, il s'agit de mettre en place des opérations conjointes (engagements de moyens, répartition des taches, échanges d'informations). Je crois avoir toujours essayé de trouver ce partenariat. Voici quelques exemples ci-dessous de mes démarches personnelles en ce sens.

L'Equipe de Microbiologie Aquatique se situe sur deux pôles géographiques (Thonon et l'Université de Savoie). Un partenariat tout naturel s'est mis en place avec **Isabelle DOMAIZON** (maître de Conférence) spécialiste des protozoaires en milieux aquatiques pour travailler ensemble sur la boucle microbienne lacustre. Nous co-encadrons ensemble la thèse de Sébastien

PERSONNIC (voir plus bas). Nous avons co-encadré d'autres étudiants en MASTER en 2002 et 2003. J'associe Isabelle à tous les projets que j'initie.

Un partenariat privilégié est né à la fin de l'année 2003 avec l'Université de Clermont-Ferrand (Laboratoire de Biologie des Protistes dirigé par Christian AMBLARD) pour le travail portant sur l'écologie des virus avec **Télesphore SIME-NGANDO** (Chargé de Recherche, CNRS). Avec Télesphore, nous accédons à une expertise et une technologie absente de Thonon qui est la microscopie électronique à transmission. Nous avons des projets de recherche en commun en cours (VIULAC, programme ECCO) ou à venir portant sur l'impact des UV et des virus sur les communautés microbiennes du lac du Bourget (Projet innovant financé par le Département EFPA de l'INRA début 2005). Un certain nombre d'articles sont publiés ou en cours de rédaction illustrant ce partenariat (voir plus bas).

Le partenariat avec l'Université de Clermont-Ferrand s'est agrandi à l'occasion de la demande du professeur **Didier DEBROAS** et de son étudiant en thèse **Ludwig JARDILLIER** de faire des analyses en cytométrie en flux concernant le compartiment viral. J'ai fait le choix dans ce dernier cas de laisser ce travail à Sébastien PERSONNIC afin qu'il puisse bénéficier de cette collaboration. Un article a été publié sur ce travail (voir plus bas).

J'ai mis en place un partenariat avec le Laboratoire de Virologie et Immunologie Moléculaire de Jouy en Josas (INRA) et plus particulièrement avec **Bernard DELMAS** pour bénéficier d'une expertise sur la caractérisation d'un virus que j'ai récemment isolé. Là encore, ce partenariat sera valorisé cette année par une publication qui sera bientôt soumise.

A ma grande tristesse, il m'a été impossible de trouver les financements de thèse pour une étudiante exceptionnelle, Solange DUHAMEL, que j'ai eu en DEA en 2004. J'ai néanmoins réussi à lui trouver une thèse chez des collègues marseillais **France VAN WAMBEKE** (Chargé de Recherche, CNRS, Laboratoire de Microbiologie et Géochimie Marine) et **Thierry MOUTIN** (Chargé de Recherche, CNRS, Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie). Il n'y a pas à ce jour de partenariat concret entre nos équipes mais la réflexion a été lancée. J'appartiens au comité de thèse de Solange.

Faisant suite à mon colloque international sur les virus, un certain nombre de partenariats a vu le jour. Un réseau français est né avec pour responsables/représentants **Markus WEINBAUER** (Laboratoire Océanologique de Villefranche-sur-Mer), **Télesphore SIME-NGANDO** (Laboratoire

de Biologie des Protistes à l'Université de Clermont-Ferrand), **Thierry BOUVIER** (Université de Montpellier), **Philippe LEBARON** (Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer) et **moi-même** (INRA de Thonon-les-Bains). Nous avons ciblé l'ensemble des scientifiques pouvant être concernés à l'échelon national et un projet est en cours de rédaction.

III. Activités d'enseignement et d'encadrement d'étudiants

III.1. L'enseignement

Mes activités d'enseignement peuvent être résumées comme suit :

A venir	**Enseignant et/ou intervenant** dans le cadre du MASTER Recherche M2 de l'Université de Clermont-Ferrand (responsable : Christian AMBLARD)
Novembre 2004	**Enseignant** dans le cadre du projet lié à l'éducation à l'environnement vers un développement durable, 1 jour, Lycées de Thonon-les-bains
Mai 2002 & 2003	**Enseignant** dans le cadre d'un DEUST Praticiens de l'eau, 2 jours pleins
Juin 2000	**Enseignant** dans le cadre d'un cours thématique pour étudiants européens sur l'analyse des particules marines (Bergen, Norvège): 1 semaine pleine
Mars 1998 & 1999	**Intervenant** dans le cadre des enseignements inter-universitaires de Phycologie: Recherches sur le picoplancton marin (Roscoff): ~10 heures
Octobre 1998	**Intervenant** dans le DEA d'Océanologie Biologie de Paris 6, option connaissance des producteurs primaires: Expériences, sujet et correction d'examens (Roscoff): 4 jours pleins
Depuis 1998 inclus	**Encadrant, enseignant et membre du jury** dans le cadre du stage de formation de plongeurs et de chef plongeurs scientifiques (Roscoff et Banyuls–sur-mer): 2 semaines pleines tous les ans

Il apparaît donc clairement que la charge d'enseignement n'est pas très importante dans mes activités mais ceci peut changer avec la mise en place du MASTER de Clermont-Ferrand et notre partenariat privilégié avec le Laboratoire de Biologie des Protistes. Il me semble intéressant de noter ici également que j'ai pu participer à la réflexion de création d'un MASTER à l'Université de Chambéry (mais qui n'a pas été accepté en 2004) et que j'avais proposé un module de formation

ainsi que sa prise en charge. Il s'agissait de *« Méthodologies Instrumentales en Limnologie (MIL) »* où les étudiants seraient confrontés au travail pratique sur le terrain dans le domaine de l'hydrobiologie en utilisant la plus grande panoplie possible de moyens techniques.

III.2. L'encadrement des étudiants

Mes activités d'encadrement et/ou d'aide à l'encadrement d'étudiants en second et troisième cycle, depuis ma nomination à l'INRA peuvent être résumées comme suit :

Anne ROLLAND. Juillet **2005**-... **Thèse de l'Université de Savoie.** Sujet : Dynamique et diversité des efflorescences phytoplanctoniques de deux lacs-réservoirs du bassin de la Seine

Bérengère TITTOT. Avril-septembre **2005**. **Stage de MASTER 2.** Sujet : Calibration d'une sonde spectrofluorimètrique utilisée dans le cadre du suivi de la qualité des eaux du lac Léman

Maria CELLAMARE. Février-juillet **2005**. **Stage de MASTER 2.** Sujet : Dynamique et diversité du pico- et nanophytoplancton des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy (essais d'isolement)

Solange DUHAMEL. Juillet-octobre **2004**. **Contrat de main d'œuvre occasionnelle** pour la valorisation des résultats acquis et un développement méthodologique avec le cytomètre en flux

Solange DUHAMEL. Février-juillet **2004**. **Stage de DEA**. Sujet : Etude de l'impact de la lyse virale sur la dynamique et la diversité de la communauté bactérienne du lac Léman

Bérengère TITTOT. Avril-juillet **2004**. **Stage de MAITRISE**. Sujet : Etude de hétérogénéité spatiale des communautés phytoplanctoniques du lac du Bourget à partir de l'exploitation des données d'une sonde spectrofluorométrique immergeable

Elena FORASCACO. Septembre **2003**-... **Thèse en co-tutelle entre les Universités de Savoie et de Milan**. Sujet : Développement d'un cladocère des eaux littorales des lacs subalpins : effets des conditions environnementales. Participation à l'encadrement de Mario COTTA RAMUSINO et Dominique FONTVIEILLE

Sébastien PERSONNIC. Septembre **2003**-…. **Thèse de l'Université de Savoie**. Sujet : Rôle des virus sur la dynamique et la diversité des bactéries et des protistes du lac Léman. Co-encadrement avec Isabelle DOMAIZON (maître de conférence à l'Université de Savoie – BOURSE MINISTERIELLE)

Sébastien PERSONNIC. Février à juillet **2003**. **Stage de DEA**. Sujet : Etude préliminaire de la dynamique des communautés virales dans les lacs d'Annecy, du Bourget et du Léman

Laura OBERHAUS. Septembre **2003**-... **Thèse de l'Université de Paris**. Sujet : Ecologie de la cyanobactérie toxique *Planktothrix rubescens* dans les lacs Léman et du Bourget. Participation à l'encadrement de Jean-François HUMBERT et Bruno TASSIN sur les premières expériences au laboratoire

Carol AVOIS-JACQUET. **2003**. **Stage de post-doctorat**. Aide à la mise en place du sujet portant sur les relations cyanobactéries-zooplancton et analyses diverses

Abdourahmane MBADE SENE. Février à septembre **2003**. **Stage de DEA**. Sujet : Etude de l'impact de la prédation planctonique sur les communautés microbiennes lacustres. Co-encadrement avec Isabelle DOMAIZON

Carine MAISONNETTE. Avril-juin **2002**. **Stage de Maîtrise**. Sujet : rôle du phosphate sur la croissance et la production de toxines de *Planktothrix rubescens*, cyanobactérie filamenteuse. Co-encadrement avec Jean-François BRIAND et Jean-François HUMBERT

Jean-François BRIAND. Mars-septembre **2002**. **Contrat post-doctoral**. Sujet: effet de la quantité et de la qualité de lumière sur la croissance de *Planktothrix rubescens*, cyanobactérie filamenteuse. Co-encadrement avec Jean-François HUMBERT

Ursula DORIGO. Septembre **2001**-... **Thèse de l'Université de Savoie**. Sujet : Dynamique et diversité des bactéries en milieu lacustre alpin. Participation à l'encadrement de Jean-François HUMBERT et Dominique FONTVIEILLE

IV. Transferts des connaissances

Depuis 2002, j'ai orienté une partie de mon activité vers le transfert de connaissances et le recrutement d'étudiants pour travailler sur les thématiques de recherche de notre équipe et plus particulièrement celles que j'ai mise en place. Dans ce but, j'écris et téléphone aux responsables des écoles doctorales d'intérêt et je mets en ligne sur le site INTERNET de la Station (http://www.thonon.inra.fr/stages/stages-frame.htm) les sujets que je conçois. Ainsi Sébastien PERSONNIC, Solange DUHAMEL et Maria CELLAMARE ont répondu à des sujets bien que venant de l'Université de Paris 6. Avec mon équipe, nous avons pu obtenir une allocation doctorale pour Sébastien. Il me semble aussi important de dire ici que je m'attache tout particulièrement à la valorisation des résultats des étudiants et la liste présentée ci-dessous en est le reflet. A cela s'ajoute l'essai de répondre à tous les appels d'offre concernant les possibilités d'obtenir des financements doctoraux et/ou post-doctoraux en accord avec les priorités locales et la politique de l'unité. La valorisation des travaux des étudiants se fait sous différentes formes (rapport diplômant classique mais surtout communication orale ou sous forme de poster dans des congrès nationaux et/ou internationaux, publications de vulgarisation, publications internationales de rang A). Je suis très

attaché à cela et un effort particulier est demandé à chacun dans ce but. En voici le reflet depuis ma prise de fonction à l'INRA de Thonon-les-Bains, en septembre 2001 :

International

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois, **C. Avois-Jacquet**, **C. Maisonnette**, B. Leberre and J.-F. Humbert. **2005**. Variations in the microcystins production of Planktothrix rubescens (cyanobacteria) assessed by a four years in situ survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. Microb. Ecol. (sous presse)

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Bernard and J.-F. Humbert. **2003**. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. Vet. Res. 34:361-378

Comte, J., **S. Jacquet**, S. Viboud, D. Fontvieille, G. Paolini and I. Domaizon. **2005**. Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, Savoie, February to July 2002). Microb. Ecol. (sous presse)

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2004**. Cyanophage diversity, inferred from g20 sequence analyses, in the largest French lake in France, Lake Bourget. Appl. Environ. Microbiol. 70:1017-1022

Dorigo, U., S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Routine quantification of freshwater microbial communities using flow cytometry and epifluorescence microscopy: case studies in French alpine lakes. Syst. Appl. Microbiol. (en révision)

Duhamel, S., I. Domaizon, **S. Personnic** and **S. Jacquet**. **2005**. Assessing the microbial community dynamics and the role of viruses as bacterial mortality agents in Lake Geneva. La Revue des Sciences de l'eau (accepté)

Duhamel, S. and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analysis of bacteria and virus-like particles in lake sediments. J. Microbiol. Methods (en révision)

Forascaco, E., S. Jacquet, R. Cotta Ramusino and D. Fontvieille. **2005**. Development of a feshwater Daphnid in near-shore waters of alpine lakes in response to environmental conditions. J. Plank. Res. (soumis)

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

Jacquet, S., **J.-F. Briand**, C. Leboulanger, **C. Avois-Jacquet**, G. Paolini, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, J.-C. Druart, O. Anneville and J.-F. Humbert. **2005**. The proliferation of the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). Harmful Algae 4: 651-672

Jacquet, S., I. Domaizon, T. Sime-Ngando and **S. Personnic**. Are classical counting methods for bacteria and viruses comparable ? En préparation

Jacquet, S., T. Sime-Ngando, **U. Dorigo**, A. Millard, B. Leberre, J. Lepault and B. Delmas. **2005**. A new virus infecting PE-rich freshwater picocyanobacteria (en préparation)

Jardillier, L., D. Boucher, **S. Personnic**, **S. Jacquet**, A. Thénot, D. Sargos, C. Amblard and D. Debroas. **2005**. Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status. FEMS Microbiol. Ecol. (sous presse)

Oberhaus, L. J.-F. Briand, J.-F. Humbert, C. Leboulanger and **S. Jacquet**. **2005**. Effects of light quantity and quality on growth and competition processes of the two cyanobacteria Planktothrix agardhii and P. rubescens (en préparation)

Personnic, S., **U. Dorigo**, B. Leberre and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analyses of microbial communities (viruses, bacteria and small phytoplancton) on Lakes Annecy, Bourget and Geneva, France (en préparation)

Sime-Ngando, T., I. Domaizon, **S. Personnic**, **U. Dorigo** and **S. Jacquet**. **2005**. Diel patterns of microbial community abundance and activity in the largest natural French lake (en préparation)

Vulgaristaion

Duhamel, S, S. Personnic et **S. Jacquet**. **2005**. Importance quantitative et fonctionnelle des bactériophages en milieu lacustre. INRA mensuel n° 122 (février), pp 8-9

Personnic, S., **S. Duhamel,** T. Sime-Ngando, Y Bettarel et **S. Jacquet**. **2005**. Virus lacustres : études sur l'écologie d'un compartiment clef longtemps ignoré. **La Recherche** (en révision)

Communications orales

Jacquet, S., B. Delmas, **U. Dorigo**, C. Six, T. Sime-Ngando and B. Leberre. A new virus infecting freshwater PE-rich picocyanobacteria in French lakes. The 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology. Thonon, France, **February 2005**.

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. Cyanophage diversity in Lake Bourget. The 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology. Thonon, France, **February 2005**.

Domaizon, I., **U. Dorigo, S. Personnic**, **J. Comte**, A. Mbade Sene, A. Millery, D. Fontvieille and **S. Jacquet**. Assessment of protozoan predation impact on aquatic bacteria: in situ experimental approaches. Pallanza, Italy, **October 2004**.

Personnic, S., U. Dorigo, S. Duhamel and **S. Jacquet**. Routine quantification of freshwater microbial communities using flow cytometry. Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, **October 2004**.

Dorigo, U., B. Leberre, **S. Jacquet**, D. Fontvieille and J.-F. Humbert. Molecular tools to assess bacterial and viral diversity. Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, **October 2004**.

Personnic, S., S. Duhamel and **S. Jacquet**. Flow cytometry and methods to assess viral-induced mortality of bacterioplankton. Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, **October 2004**.

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois, **C. Avois-Jacquet**, **C. Maisonnette**, **C. Freissinet**, B. Leberre, J.-P. Bosse and J.-F. Humbert. Variations in the microcystins production of Planktothrix rubescens (cyanobacteria) assessed by a four years in situ survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. VI International Conference on Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norvège, **June 2004**.

Dorigo, U., S. Jacquet et J.-F. Humbert. Diversité génétique des cyanophages dans le lac du Bourget. GRISCYA, Paris, France, **novembre 2003**.

Oberhaus, L, J.-F. Briand, J.-F. Humbert, **S. Jacquet**, C. Leboulanger, B. Tassin, B. Vinçon-Leite and N. Zevros. L'écologie de Planktothrix rubescens dans le lac du Bourget et le lac Léman: dynamique in situ, expériences en laboratoire et modélisation. GRISCYA, Paris, France, **novembre 2003**.

Oberhaus, L., **C. Avois-Jacquet**, **J.-F. Briand**, J.-F. Humbert, **S. Jacquet**, G. Paolini, B. Leberre, C. Leboulanger, B. Tassin, B. Vinçon-Leite and N. Zevros. The ecology of Planktothrix rubescens in Lake Bourget and Lake Geneva: in situ dynamics, laboratory experiments, and modelling. ENS Paris, France, **June 2003**.

Dorigo, U., **S. Jacquet** et J.-F. Humbert. Diversité génétique des cyanophages dans le lac du Bourget. CILEF, Montréal, **Canada**, **Juillet 2003**.

Communications sous forme de poster

Jacquet, S. and **S. Duhamel**. A new method to count bacteria and viruses in lake sediments. The 4th Algal Virus Workshop, Amsterdam, **April 2005**.

Personnic, S., I. Domaizon, A. Millery and **S. Jacquet**. Dynamics and interactions within the microbial communities of lake Geneva with a dominant viral axis. The 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology. Thonon, France, **February 2005**.

Personnic, S., I. Domaizon, **S. Duhamel** and **S. Jacquet**. Enumerating aquatic viruses and assessing their role as mortality agents of bacterial populations using FCM and TEM. 1st Meeting of Swiss Microbial Ecologists, Neuchatel, Switzerland, **September 2004**.

Briand, J.-F., L. Oberhaus, C. Leboulanger, **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. Croissances comparées de deux cyanobactéries : Planktothrix agardhii et P. rubescens soumises à diverses quantités et qualités de lumière. CILEF, Montréal, Canada, **Juillet 2003**.

Comte, J., S. Jacquet, D. Fontvieille and I. Domaizon. Etude préliminaire du réseau trophique microbien dans le lac du Bourget (Savoie, France). CILEF, Montréal, Canada, **Juillet 2003**.

Dorigo, U., S. Jacquet and J.-F. Humbert. Dynamics and diversity of heterotrophic bacteria in Annecy, Bourget and Geneva lakes. 1st FEMS Symposium, Ljubljana, Slovenia, **June 2003**.

Briand, J.-F., L. Oberhaus, J.-F. Humbert, C. Leboulanger et **S. Jacquet**. Etude de l'influence de la qualité et de la quantité de lumière sur la croissance de Planktothrix rubescens et P. agardhii (cyanobacteria). Conférences INRA sur la Microbiologie, Paris, France, **Mai 2003**.

Dorigo, U., S. Jacquet et J.-F. Humbert. Dynamique et diversité des communautés bactériennes hétérotrophes dans les 3 lacs sub-alpins : Annecy, Bourget, Léman. Conférences INRA sur la Microbiologie, Paris, France, **Mai 2003**.

Dorigo, U., S. Jacquet, I. Domaison, **C. Avois-Jacquet, L. Oberhaus**, J.-C. Druart, C. Leboulanger, D. Fontvieille and J.-F. Humbert. Diversité comparée des communautés microbiennes planctoniques des trois grands lacs naturels français de l'arc alpin: Annecy, Bourget, Léman. Les journées de l'institut français de la biodiversité, Tours, **décembre 2002**.

Le transfert de connaissances et/ou d'informations est également réalisé au travers de mon site INTERNET sur lequel on peut accéder à :

- un répertoire dédié aux étudiants portant sur l'ensemble des formations nationales ayant trait aux sciences de l'environnement aquatique (http://jacquet.stephan.free.fr/repertoire.htm) ;
- des diaporamas de nos thématiques de recherche correspondant aux présentations de l'équipe dans des congrès nationaux et/ou internationaux (http://jacquet.stephan.free.fr/.diaporamas.htm)
- la liste de l'ensemble des publications de notre équipe depuis 1999 et dont la plupart peut être téléchargée (http://jacquet.stephan.free.fr/publications.htm)

J'ai été invité à **donner une conférence** à l'Institut de Limnologie de l'Académie des Sciences en Autriche par son Directeur, le professeur Thomas WEISSE. Cette invitation fait suite à notre première rencontre en Italie en 2004 pendant le *Workhop on Aqautic microbial loop* où il s'est dit impressionné par la qualité de nos travaux J'irai à la fin de l'année 2005.

J'ai été invité à **donner une conférence** au Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-mer par Jean-Pierre GATTUSO (Directeur de Recherche, CNRS, responsable de l'équipe Diversité, Biogéochimie et Écologie microbienne planctonique). Cette invitation m'a été renouvelée par Markus WEINBAUER en mai 2005. Je ne sais pas encore quand j'irai.

J'ai été invité à **donner une conférence** au NIOZ Institute aux Pays Bas, à la demande du Professeur Hermann GONS, suite au congrès portant sur les virus de microalgues (AVW4) auquel j'ai participé en avril. Il s'agit aussi d'une retombée de mon propre workshop. J'irai en automne 2005.

J'ai été invité à **donner une conférence** à la demande du Professeur Philippe LEBARON au prochain congrès national de cytométrie qui aura lieu à Paris le 17 novembre. Mon intervention portera sur l'application de la cytométrie en flux à l'étude de l'écologie virale aquatique.

Et la transition est toute trouvée. **La Cytométrie en flux** constitue un énorme travail dans le domaine du transfert. Les différents travaux sont explicités ci-dessous :

A. Avec et pour **Isabelle DOMAIZON**, je participe au projet de déterminer l'importance relative des ressources et de la prédation dans l'organisation des réseaux trophiques pélagiques et la biodiversité bactérienne. En plus de nos propres projets (voir plus bas), la cytométrie en flux a été nécessaire dans le cadre d'une étude d'une durée de 21 jours qui s'est déroulée sur le site expérimental de Cordelle, en bordure du la retenue de Villerest (28 mésocosmes de 5.5 m^3). Les effets ascendants ont été testés par manipulations des apports en éléments nutritifs (azote et phosphore), ces éléments ayant un impact direct sur le développement phytoplanctonique et les teneurs en matière organique dissoute disponible pour le compartiment bactérien. Les effets descendants ont été étudiés par manipulations des prédateurs, l'absence ou la présence de poissons planctophages agissent directement sur la structure des populations zooplanctoniques et, en cascade, des populations de la boucle microbienne. Deux niveaux en éléments nutritifs (apports élevés en azote et phosphore, apports faible en azote et phosphore) ainsi que deux niveaux de prédation (absence et présence de poissons) ont été testés de manière croisée. Les plans factoriels d'expérience croisant les gradients de nutriments et de charge en poissons sont les plus aptes à apporter des réponses précises sur l'interaction ressources x prédateurs. En réponse à la pression de prédation et aux ressources disponibles, ont été observés les effets: (i) sur le développement des protistes autotrophes, hétérotrophes et mixotrophes, (ii) sur le développement et la composition des bactéries hétérotrophes, (iii) sur la concentration en matière organique (dosages des protéines et sucres dissous)

Ce travail est achevé et en cours de publication.

B. Avec et pour **Ludwig JUDILLIER**, Sébastien PERSONNIC et moi-même avons contribué à une étude consistant à déterminer l'impact des ressources et de la prédation sur la structure de la communauté bactérienne en milieu aquatique. Si diverses études ont montré que la structure de la communauté bactérienne présentait des variations saisonnières et spatiales, peu se sont attachées à étudier *in situ* l'impact combiné de ces deux facteurs. Cette étude a pris en compte aussi bien les protistes flagellés et ciliés que le zooplancton comme prédateurs potentiels du bactérioplancton. Afin de déterminer les rôles du bottom-up et du top-down dans le contrôle de la diversité bactérienne en milieu lacustre, trois expériences en microcosmes ont été réalisées sur trois lacs de niveaux trophiques différents : le lac Pavin (Oligo-mésotrophe), le réservoir du Sep (Oligo-mésotrophe) et le lac Aydat (Eutrophe). L'étude de l'effet des ressources a été réalisée par enrichissement de 9 microcosmes en azote (NH_4Cl, $NaNO_3$) et phosphore (KH_2PO_4), 9 autres microcosmes présentant les concentrations en azote et phosphore du lac. L'effet de la prédation a été croisé avec l'effet des nutriments, par filtrations différentielles : la fraction < 1.2 µm servant de témoin avec une absence de prédateurs, la fraction < 10 µm permettant d'observer l'impact de la communauté flagellée et la fraction UNF correspondant à une communauté bactérienne soumise à la prédation de l'ensemble des communautés de prédateurs. L'étude de la structure de la communauté bactérienne a été réalisée par la méthode FISH (sondes EUB338, ARCH915, ALF1b, BET42a, CF319a) et par la T-RFLP (enzymes de restriction *Msp*I et *Rsa*I). L'activité de cette communauté a été déterminée globalement par une mesure de production au moyen de la méthode basée sur l'assimilation de thymidine ^3H. Les différentes communautés de prédateurs ont été dénombrées : flagellées, ciliées et zooplanctoniques. L'activité bactérivore de chaque communauté a également été déterminée par la méthode basée sur l'ingestion de microsphères fluorescentes. Les concentrations en azote (NH_4 et NO_3) et phosphore (PO_4) ont été déterminées sur l'ensemble des microcosmes. Notre travail a consisté à analyser (dénombrer) les compartiments bactérien et viral.
Ce travail est achevé et publié.

C. Avec et pour **Christophe LEBOULANGER,** j'ai utilisé la cytométrie de flux pour le dénombrement de cultures de "*Chlorella*" afin de proposer une méthode de dénombrement rapide et précise pour: (i) vérifier l'homogénéité des échantillons et clones employés en terme de signature cytométrique (niveaux de fluorescence, taille

apparente…), à relier éventuellement à "l'homogénéité phylogénétique" observée en biologie moléculaire, étalonner les différentes méthodes d'estimation de la biomasse employées en routine dans le stage d'Aurélie VILLENEUVE (DO à 650 nm et dénombrements au microscope), (ii) assurer la plus grande précision possible dans l'estimation de la densité des populations utilisées lors des expérimentations de sélection par un herbicide. 6 souches de *Chlorella* en milieu L-C, non axéniques ont été employées, trois considérées comme "sauvages", n'ayant pas subi de sélection particulière depuis leur isolement, et trois souches considérées comme "mutantes", c'est à dire ayant été isolées après un processus de sélection, et montrant une résistance accrue à l'herbicide utilisé comme agent sélectif (l'irgarol). Pour calculer les taux de mutations, il était nécessaire de connaître le plus précisément possible les densité cellulaires dans les cultures expérimentales au début et à la fin de l'expérience, mais également au cours de la croissance des organismes. Le problème se pose ici dans le sens où les densités cellulaires à évaluer sont extrêmement faibles, ce qui implique de sacrifier la totalité d'un échantillon pour effectuer la mesure. Nous avons résolu ce problème en prévoyant plus de cultures que prévu pour l'analyse des résultats finaux (en microplaques, 96 culture par plaque) pour disposer de suffisamment de matériel; dans ce cas, les prises d'essai/mesure seront de 200 µL soit la totalité de la cupule. Les mesures nécessaires ont été: (i) la densité cellulaire à t0, sur les 6 souches, soit 6 échantillons à traitement immédiat, (ii) la densité cellulaire sur 18 cupules, tous les deux jours pendant 7 à dix jours, soit au maximum 18 échantillons par jour et 90 au total, à traitement immédiat, (iii) la densité cellulaire sur au maximum 16 cupules par plaque sur 18 plaques, soit 288 échantillons en milieu d'expérimentation (entre 7 et 10 jours après le début), à traitement immédiat pour le maximum d'entre eux si possibilité de fixer le reste des échantillons, (iv) la densité cellulaire sur toutes les cupules ayant montré une croissance significative après 30 jours (impossible à estimer précisément, quelques dizaines au grand maximum).

Ce travail et tout ce qui est associé à l'aspect *Ecotoxicologie* de l'équipe continue avec **Agnès BOUCHEZ** et **Aurélie VILLENEUVE**. Des dénombrements en cytométrie en flux sont réalisés pour les communautés de microalgues, bactéries hétérotrophes et virales dans le cadre d'expérimentations en canaux où des biofilms (de diversité variable) sont exposés à des concentrations de toxique.

D. Avec et pour **Delphine LATOUR**, la cytométrie en flux a été utilisée à plusieurs reprises pour tenter d'observer des virus spécifiques à la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*, une cyanobactérie coloniale proliférant sur la retenue de Grangent (Loire). Nous n'avons pas obtenu de bons résultats, c'est-à-dire que nous n'avons pas obtenu une signature cytométrique permettant de conclure sans ambiguïté à la présence remarquée d'un virus spécifique à la cyanobactérie en fin de bloom par exemple. De plus, j'ai assuré une formation spécifique pour la détection des virus de manière à rendre Delphine autonome dans son travail post-thèse avec le service médical de l'hôpital de Saint-Etienne, détenteur d'un cytométre en flux et d'une technicienne associée aux analyses médicales mais qui n'avait pas l'expertise dans l'étude des communautés microbiennes aquatiques. C'est chose faite maintenant !
Ce travail est achevé.

E. Avec et pour **Elena FORASCACO**, la cytométrie en flux a été utilisée dans le cadre de sa thèse concernant la biologie des populations de macrofiltreurs zooplanctoniques et leurs relations avec les populations microbiennes. Cette recherche a eu pour objectif l'étude de la biologie des populations du genre *Simocephalus*, un cladocère planctonique (famille Daphniidae), caractérisé par une grande variabilité et donc capable de s'adapter à différentes situations de l'environnement. L'étude a porté sur les populations présentes dans le lac du Bourget (Savoie, France) et le lac Iseo (Lombardie, Italie du Nord). La dynamique saisonnière des différentes espèces, leur distribution spatiale et la variabilité génétique interspécifique ont été analysées. La recherche des clones de *Simocephalus vetulus* a également été effectuée avec pour objectif de comprendre comment ils se suivent par rapport aux changements des paramètres environnementaux, biotiques et abiotiques. Ce travail a été effectué en analysant l'ADN génomique des individus avec la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Parallèlement, les ressources alimentaires disponibles en évaluant l'abondance des bactéries divisés en classes de taille avec la cytomètre et en classifiant le phytoplancton ont été évaluées tous les mois pendant 1 année complète.
Ce travail est achevé.

F. Avec et pour **Amandine CARUANA**, la cytométrie en flux est utilisée pour des tests d'axénicité de cultures de *Microcystis aeruginosa* mais aussi pour le suivi de la croissance de clones toxiques et non toxiques de la cyanobactérie sous différentes

conditions environnementales dans le but d'évaluer la toxicité des différents clones en réponse aux fluctuations de l'environnement.
Ce travail continue.

G. Avec et pour **Dominique FONVIEILLE,** un suivi des communautés bactérienne et virale a été réalisé à partir d'échantillons de biofilms provenant d'une source hydrothermale (Aix-les-Bains). Les résultats en terme de bactériologie montrent plusieurs différences que l'on attribue à l'infiltration d'eaux de surface. Entre le 3ème et le 6ème jour, (i) il y a diminution des bactéries totales dans les deux cas, (ii) il y a augmentation des légionelles totales mais moins dans l'expérience 2 que dans l'expérience 1, (iii) certains sérotypes de légionelles augmentent dans l'exp1 et diminuent dans l'exp2, (iv) pour les amibes, l'ordre de grandeur est le même dans les deux expériencs et leur concentration n'évolue pas entre J3 et J6. Les virus, analysés par cytométrie en flux, pourraient donc être responsables de la diminution de certains groupes bactériens ou de l'écrêtage des amibes car elles n'ont pas en principe de prédateur dans ce milieu. L'interprétation n'est donc pas simple ! Cette étude va être poursuivie dans le cadre d'une étude financée par l'AFSEE intitulée « étude des facteurs de régulations des légionelles dans les biofilms des réseaux de distribution des thermes d'Aix-les-Bains.
Ce travail continue.

H. Pour **Jean-Philippe TORRETON**, la cytométrie en flux est utilisée pour l'analyse d'échantillons en provenance des lagons océnaiques autour de Nouméa pour détecter et déterminer la distribution spatiale des virus, des bactéries hétérotrophes et du picophytoplancton (*Prochlorococcus*, *Synechococcus* et les picoeucaryotes). Après discussion et définition du protocole, ce travail a été confié à Sébastien PERSONNIC qui avait initié cette collaboration à l'origine de part son intérêt pour le domaine marin.
Ce travail continue.

I. Avec et pour **Franck POLY**, une démonstration et un cours d'utilisation de la cytométrie en flux a été réalisé, avec pour principale objectif la détection et le comptage de bactéries isolées.

J. Avec et pour **Sébastien PERSONNIC, Solange DUHAMEL, Ursula DORIGO et Maria CELLAMARE**, nous avons travaillé et travaillons encore avec le cytométre en flux pour optimiser l'ensemble de ces performances en terme de dénombrements des communautés microbiennes mais aussi pour trier et cultiver des populations encore non identifiées à la base du réseau trophique pélagique pour les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget.

K. Avec et pour **Rémy TADONLEKE**, dans le cadre d'un projet portant sur l'évaluation de la toxicité de différents produits de dégradation d'un herbicide (le Diuron) sur les microalgues et les bactéries, j'ai utilisé la cytométrie en flux pour tester le degré de contamination bactérienne d'échantillons de cultures de microalgues et un suivi des abondances et autres paramètres physiologiques de ces cultures a été réalisé. Des colorants comme le DIBAC ou le kit LIVE/DEAD BACTLIGHT sont utilisés.

V. Membres de jury, expertise, évaluateur

J'ai été **évaluateur d'un projet européen** durant l'hiver 2004 et voici la réponse faite à mon acceptation:

> On behalf of the Council for the Earth and Life sciences I would like to thank you very much for you kind offer to review an ALW proposal. Since the NWO grant award procedure is highly competitive, we would appreciate detailed comments supported by careful arguments. These will be used by the Council's grant review committee to compare this proposal with others submitted and to determine funding priorities. Your identity will not be revealed to anyone outside this office. Your advice and that of the other reviewers will remain anonymous to the applicants. I have included a standard review form with some keywords that reflect essential criteria we would like you to cover in your review. Feel free, however, to add any information you think will be useful to the committee. Please use the full range of the assessment scale without introducing any intermediate gradings. NWO normally sends referees' comments (in anonymous form) to the applicants in advance of the committee meeting. This provides the applicants with the opportunity to respond to any criticisms or points raised by the referees. I would therefore be grateful, if you would avoid any reference to your identity. The referee reports and applicants' responses are sent to committee members to be considered in advance of the meeting. Because all of this takes some time, we need to receive your reply (preferably by e-mail) at the address below before October 31th next. Please do not hesitate to contact me personally if you have any queries about the content of the papers or about the nature of the comments we are seeking. Otherwise, I would be grateful if you would send your comments to our office. We will of course let you know the outcome of this application following the Council's decision. We trust that you will treat the enclosed proposal as confidential; no parts should be copied, quoted or used in any way, nor should the author's name be revealed. Many thanks for your cooperation.

J'ai su que ce projet n'avait pas été retenu au final.

J'ai été **Evaluateur d'un projet de recherche pour le Ministère de la culture, de l'enseignement supérieur et de la recherche Luxembourgeois** en août 2004 pour un projet de financement de thèse. Cette thèse a été financée.

Depuis quelques années, j'ai l'occasion d'être « **referree » pour certaines revues internationales de rang A**. Il s'est agit, à ce jour, de :

Aquatic Microbial Ecology

FEMS Microbiology Ecology

Journal of Plankton Research

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences

International Journal of Limnology

Marine and Freshwater Research

Journal of Geophysical Research (Biology)

J'ai été **membre de jury** de deux **MASTERS** de l'Université de Savoie, en 2002 et en 2003.

Je suis chaque année **membre du jury** pour la qualification à l'habilitation de chef de **plongée** scientifique du CNRS.

Au mois de mai 2005, j'ai accepté d'être **membre extérieur de la commission de spécialistes des sections 64 à 68 de l'Université de Savoie**.

VI. Contrats et projets

VI.1. Demandeur/porteur

2002 :

- La Fondation pour la Recherche Médicale : dynamique et diversité virale lacustre (20 000 Euros)
- Projet fléché INRA : fonctionnement & achat d'une caméra CCD refroidie (9 000 Euros)
- Financement par l'INRA et l'Université de Savoie pour l'achat d'un cytomètre en flux (70 000 Euros)

2003 :

- Demande de financement pour post-doctorat étranger à l'INRA (obtenu pour 3 mois sur les 12 demandés. J'ai fait le choix de refuser)
- Candidat à une ACI Jeunes Chercheurs (non obtenu)
- Demande de financement à la région pour post-doctorat à la région Rhône Alpes (Non obtenu)

2004 :

- Demande de financement pour post-doctorat étranger à l'INRA (non obtenu)
- Demande d'un soutien financier sur projet fléché 2004 (non obtenu)
- Demande d'une bourse de doctorat à l'Agence de Bassins, la CIPEL, la Région, l'INRA (non obtenu)
- Candidat à une ACI Jeunes chercheurs (non obtenu)
- Demande de crédits sur fonds propres de l'unité pour l'achat du second laser pour le cytomètre en flux (10 000 Euros)

2005 :

- Projet innovant du département EFPA sur les UV (8 000 Euros)
- European Science Fundation pour l'organisation du colloque EWAPE-1 (14 000 Euros)
- La Station INRA de Thonon pour l'organisation du colloque EWAPE-1 (1 500 Euros)
- Université de Savoie pour l'organisation du colloque EWAPE-1 (3 000 Euros)
- Département EFPA de l'INRA pour l'organisation du colloque EWAPE-1 (1 500 Euros)
- Conseils régionale Rhône-Alpes et général Haute Savoie pour l'organisation du colloque EWAPE-1 (2 500 Euros)
- ACI Jeunes chercheurs et appel d'offre Biodiversité ANR (en attente)
- Demande de bourse post-doc à l'Université de Savoie et à l'Europe (en attente)

VI.2. Collaborateur

2003 :

- Programme national/ACI – FNS: « ECCO »ECOSPHERE CONTINENTALE: Processus et Modélisation: Projet DYLACHEM = DYnamqiue LACustre et HEtérogénéité biogéochiMique (20 000 Euros). Resp : E Viollier (Université Paris 7)

2004 :

- Suivi de la qualité des eaux du lac du Bourget 2004-2005 (contrat CISALB, 90 000 Euros)

- Programme Emergence de la Région Rhône Alpes sur la Dynamique et la diversité bactérienne lacustre (35 000 Euros). Resp : JF Humbert
- Projet ECCO sur les virus (10 000 Euros). Resp : T Sime-Ngando (Université Clermont-Ferrand 2)
- ACI Microbiologie (8 000 Euros). Resp : C Amblard (Université Clermont-Ferrand 2)

2005 :

PARTIE B

Activités de recherche – Le modèle du lac du Bourget pour l'étude de la boucle microbienne

I. Introduction générale

Small is beautiful

Raven

I.1. Généralités sur la boucle microbienne

Par leur abondance et leur diversité structurelle, génétique et fonctionnelle, les microorganismes jouent un rôle prépondérant dans les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques. Les relations trophiques entre ces microorganismes forment un véritable réseau à l'intérieur duquel la boucle microbienne (incluant bactéries auto- et hétérotrophes, protozoaires flagellés et ciliés, et les virus) permet le transfert d'une partie de la production picoplanctonique (organismes de taille inférieure à 2-3 µm) vers les niveaux trophiques supérieurs (Azam et al. 1983, **Figure 1**).

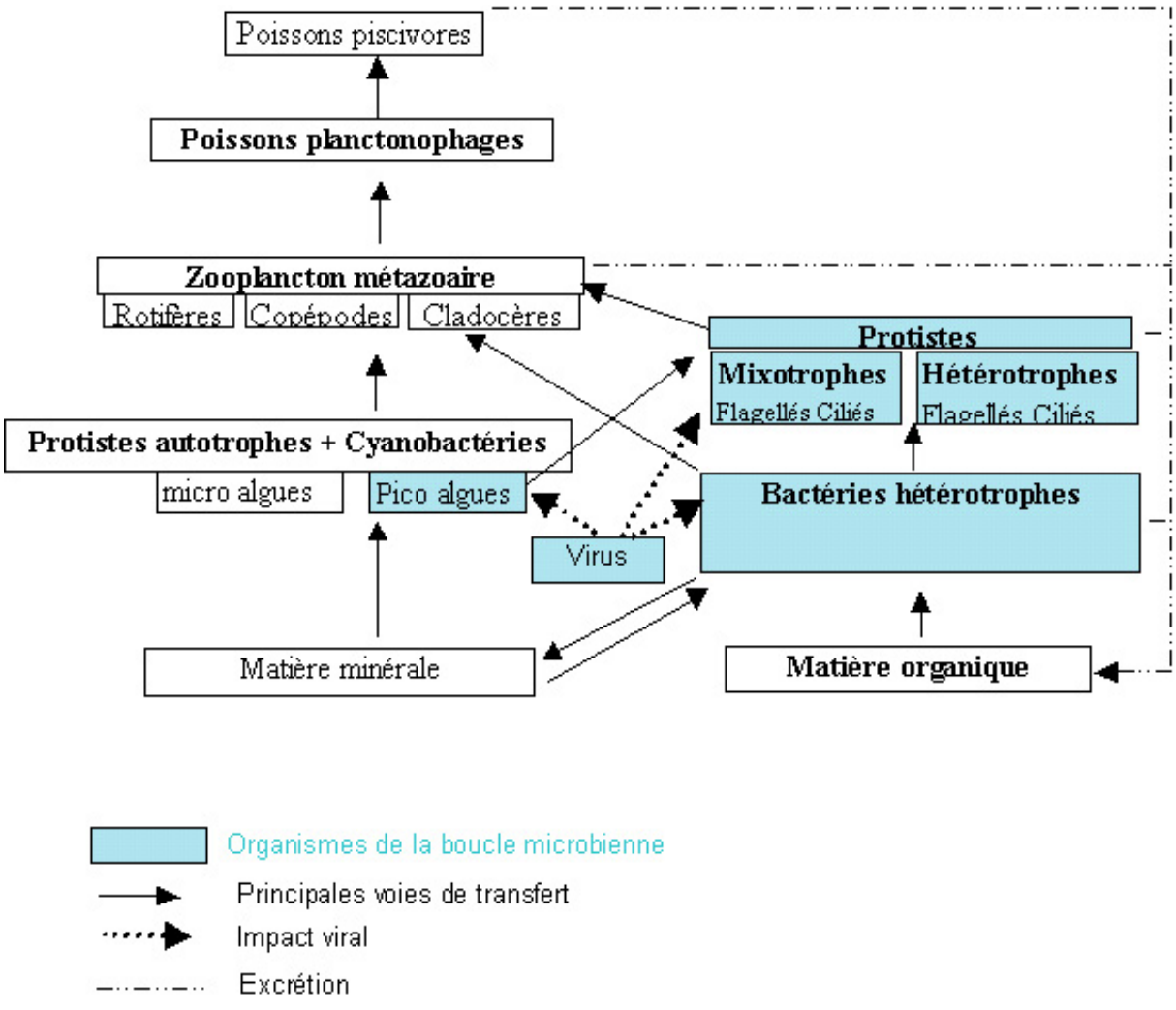


Figure 1 : Schéma résumant les grands compartiments et grandes voies de transfert au sein du réseau trophique pélagique lacustre.

La boucle microbienne désigne donc un concept utilisé pour expliquer la participation des microorganismes dans le recyclage des nutriments et au sein du réseau trophique des écosystèmes aquatiques. La boucle microbienne est pour l'essentiel une chaîne alimentaire qui travaille parallèlement et à l'intérieur de la chaîne classique. Sa composante biologique clef est les bactéries hétérotrophes ou bacterioplancton. Caractéristique du picoplancton, le bactérioplancton est le principal agent de recyclage des nutriments et de la décomposition de la matière organique dans la zone pélagique des écosystèmes dulçaquicoles (Fisher et al. 2000). Il constitue en apparence la composante biologique la plus stable en terme d'abondances (Jürgens & Güde 1994) et avec des concentrations variant généralement entre 10^5 et $2x10^6$ cellules.ml^{-1}, sa biomasse peut être plus importante que celle du phytoplancton (Thouvenot et al. 2000). Source de carbone importante et fournisseur d'éléments inorganiques dans la zone euphotique, il constitue donc un compartiment biologique clef à la base du réseau trophique assurant donc de manière indirecte le développement des producteurs primaires. En raison de cette importance, la distribution et la diversité des bactéries dans les milieux aquatiques ont fortement attiré l'attention et suscité l'intérêt des chercheurs depuis environ 30 ans (Pomeroy 1974, Hobbie et al. 1977). Depuis un peu plus de 10 ans, c'est le développement des outils empruntés à la Biologie moléculaire et de leur application aux sciences aquatiques qui a permis de révéler petit à petit l'identité des microorganismes caractéristiques des *Bacteria* (ex Eubacteria) et des *Archea* (ex Archeabacteria), deux domaines distincts de l'arbre phylogénétique représentant l'ensemble du monde microbien (Woese 1987, González and Moran 1997, Pinhassi et al. 1997, Suzuki et al. 1997, Pernthaler et al. 1998, Glöckner et al. 2000, Zwisler et al. 2003, Church et al. 2003). Aujourd'hui, outre la volonté de continuer à identifier ces micro-organismes et d'en découvrir de nouveaux, de nombreuses études tendent à mettre en évidence des variations de la composition de la communauté bactérienne au cours du temps, en fonction de la productivité des écosystèmes (Yannarel 2003) ou encore de relier physiologie cellulaire et interactions entre ces microorganismes (Wagner 2005). La température, les ressources nutritives, l'impact de la prédation et de la lyse virale (Wright 1988, Sanders et al. 1992, Fuhrman 1999) sont autant de facteurs ou processus majeurs susceptibles de contrôler la dynamique et la diversité du bactérioplancton. Parmi les ressources, les substrats organiques labiles produits par le phytoplancton représentent un des facteurs potentiels de limitation de la croissance bactérienne (Cole et al. 1982, White et al. 1991). Il a également été montré combien les nutriments inorganiques sont importants dans la croissance des bactéries (Currie 1990, Felip et al. 1996, Morris et al. 1992, Vadstein et al. 2003) et la dynamique du carbone au sein du réseau trophique microbien (Pace & Cole 1996, Olsen et al. 2002). Parmi les facteurs susceptibles de contrôler l'abondance et la diversité bactérienne, les nanoflagellés hétérotrophes et mixotrophes ainsi que les ciliés ont été très souvent cités (Sanders et al. 1989, Šimek et al. 1990, Berninger et al. 1991, Domaizon et al. 2003).

Mais ils ne sont pas les seuls, puisqu'en milieu lacustre les cladocères du genre *Daphnia* mais aussi les rotifères peuvent dans certains milieux et à certaines époques de l'année présenter un impact de prédation important sur les communautés bactériennes (Arndt 1993, Jürgens 1994, Ooms-Wilms 1997, Thouvenot et al. 1999, Langenheder and Jürgens 2001, Vadstein et al. 2003). Depuis le début des années 90 enfin, il a été mis en évidence combien les virus pouvaient jouer un rôle important dans le contrôle des populations bactériennes, tant du point de leur dynamique que de leur diversité, voire même de leur évolution (Fuhrman 1999, Sime-Ngando et al. 2003, Weinbauer 2004). Par exemple, les virus en milieu lacustre peuvent être responsables en moyenne de 10 à 60% de la mortalité bactérienne journalière (Jacquet et al. 2005). Un effort important a été consenti ces dernières années afin de préciser l'importance relative des pertes, d'une part par lyse virale, et d'autre part par prédation, qui affectent les communautés de la boucle microbienne en milieu lacustre.

De nombreux travaux ont déterminé, dans le cadre de l'étude du réseau trophique microbien, les principaux facteurs qui contrôlent l'abondance bactérienne totale et ont ainsi conduit à l'élaboration de modèles de fonctionnement local ou global (Ducklow 1994, Gasol 1994, Blackburn et al. 1997, Thingstad and Lignell 1997, Thingstad, 2000). Le contrôle des abondances bactériennes semble ainsi plus contrôlé par les nutriments en milieu oligotrophe alors que c'est la prédation qui l'emporte dans les milieux plus eutrophisés (Sanders et al. 1992). Aucun schéma général ne semble encore se dessiner en milieu lacustre pour les virus comme agents de mortalité du bactérioplancton même si leur abondance est plus élevée dans les milieux les plus eutrophes (Bettarel et al. 2003).

L'état de nos connaissances sur les principaux facteurs contrôlant la diversité bactérienne est encore peu avancé. Quelques études saisonnières en environnement lacustre ont montré l'impact des ressources carbonées et des nutriments minéraux sur la composition de la communauté bactérienne (Lindström 2000, Fisher et al. 2000, Muylaert et al. 2002, Jardillier et al. 2004, Haukka et al. 2005). Différentes études expérimentales ont montré que la prédation par les protistes et le zooplancton pouvait entraîner des changements au niveau de la composition de la communauté bactérienne des eaux douces (Hahn et al. 1999, Muylaert et al. 2002, Šimek et al. 1999, Jardillier et al. 2004) ; la morphologie des bactéries étant le critère dominant dans la sélection des prédateurs (Šimek and Chrzanowski 1992, Brendelberger and Geller 1985, Jürgens et al. 1999). D'autres paramètres pourraient intervenir comme la concentration en bactéries (Boenigk et al. 2002), la digestibilité des cellules (King et al. 199, Langenheder and Jürgens 2001, Matz et al. 2004), la motilité (Matz and Jürgens 2003), la vitesse de nage des cellules (Matz et al. 2002), les propriétés des membranes bactériennes (Hahn and Höfle 2001). Enfin, il semblerait que les virus soient les acteurs les plus performants dans le contrôle et les modifications de la diversité bactérienne en milieu aquatique,

une thématique très largement sous-estimée jusqu'à aujourd'hui (Middelboe 2002, Weinbauer & Rassoulzadegan 2004, Suttle 2005).

Pour conclure sur le compartiment bactérien, il apparaît très clairement eu regard à la littérature, que parmi les principaux facteurs susceptibles de structurer les populations bactériennes, l'impact de la prédation a été le mieux et le plus étudié comparativement à l'impact de la quantité et de la qualité des ressources nutritives ou encore de celui des virus. Très peu d'études se sont simultanément intéressées à la prise en compte de l'ensemble de ces facteurs explicatifs pour déterminer leur importance relative (Šimek et al. 2003, Jardillier et al. 2004).

L'un des enjeux actuels en écologie aquatique est la compréhension des mécanismes de régulation de la diversité et de l'activité des communautés naturelles et de leur impact sur le fonctionnement de l'écosystème. Cette question est particulièrement pertinente dans le cas des micro-organismes qui jouent un rôle écologique majeur et dont l'étude de la diversité nécessite la mise en œuvre de techniques nouvelles (cytométrie en flux, biologie moléculaire). Comme je l'ai esquissé ci-dessus, on ne sait encore que peu de choses sur l'écologie (dynamique des populations) et la diversité des microorganismes, qu'il s'agisse des virus, des bactéries voire même des protistes. Ceci est particulièrement vrai pour les plus grands lacs naturels français (Annecy, Bourget, Léman). Par exemple, la fraction végétale du picoplancton (cyanobactéries et micro-algues appelées communément picoeucaryotes), longtemps ignorée en raison de sa petite taille, est aujourd'hui reconnue comme une composante majeure des écosystèmes aquatiques, un maillon clef à la base des chaînes trophiques (Callieri & Stockner 2002). Une rapide revue de la littérature révèle que cette lacune de connaissances est particulièrement marquée notamment en France en ce qui concerne le milieu lacustre (Stockner et al. 2000, Domaizon et al. 2003). Pourtant, l'intérêt à porter au picophytoplancton est évident dans le contexte d'une meilleure compréhension (plus globale) du fonctionnement des écosystèmes aquatiques puisque ce fonctionnement est directement dépendant de la structure des communautés au sein de laquelle les plus petits organismes ont un rôle déterminant. Bien que moins abondante que les bactéries hétérotrophes, la communauté picophytoplanctonique, particulièrement des picocyanobactéries, peut être une source de carbone plus importante que les bactéries hétérotrophes (Weisse 1993). Récemment, il a été démontré que des expériences de fertilisation à l'échelle d'un lac augmentait la production de carbone de ces picocyanobactéries, ce qui affectait positivement la production de l'ensemble de la chaîne trophique jusqu'aux poissons (Domaizon et al. 2003). Je pense qu'il est urgent aujourd'hui que les limnologues s'intéressent à la contribution du picophytoplancton sous sa forme unicellulaire ou coloniale dans les flux d'énergie des lacs de tous les types trophiques. Notre chance est de disposer de tels modèles d'étude. En effet, les écosystèmes que nous étudions sont soit oligotrophe (lac

d'Annecy) ou mésotrophes et tendant vers la première situation trophique (lac du Bourget et lac Léman). Ainsi, pour ces deux derniers systèmes, je pose l'hypothèse que l'on devrait observer dans les prochaines années :

- ⇨ l'augmentation progressive de l'importance relative du compartiment picophytoplanctonique à la biomasse et à la production phytoplanctonique (comme une réponse à la réoligotrophisation de la plus grande compétitivité des formes biologiques les plus petites vis-à-vis des ressources nutritives);
- ⇨ et comme voie de conséquence, une augmentation du rôle de la boucle microbienne dans le transfert des flux de matière vers les niveaux trophiques supérieurs.

On comprend dès lors toute l'importance de commencer à s'intéresser en détail à ces communautés d'autant plus qu'il pourrait être possible d'utiliser le picoplancton comme marqueur des changements naturels ou anthropiques dans les milieux lacustres en proie à des changement climatiques globaux (augmentation des températures, accroissement de la dose des ultraviolets dans les eaux de surface) et à une eutrophisation des milieux grandissante ou à l'inverse à une restauration de ces écosystèmes.

Depuis 2002, je m'intéresse à la structure et au fonctionnement de la boucle microbienne du lac du Bourget, c'est-à-dire aux communautés microbiennes de type virale, bactérienne et protiste. Au travers d'un suivi régulier des abondances de ces populations et d'expériences ciblées (notamment au moyen de microscosmes) pour appréhender diversité et/ou fonctionnalité des ces communautés, mon objectif est de mieux comprendre le fonctionnement de la base du réseau trophique pélagique du plus grand lac naturel français. Les questions posées sont les suivantes :

- ➢ Quelle est la dynamique des communautés microbiennes ?
- ➢ Quelle est la diversité des communautés microbiennes ?
- ➢ Quel est l'impact de la prédation sur les communautés microbiennes, en terme de dynamique et de diversité ?
- ➢ Quel est l'impact de la lyse virale sur la dynamique et la diversité bactérienne ?

Nous examinons également les lacs Léman et d'Annecy en terme de dynamique des communautés microbiennes, caractérisés par des statuts trophiques différentes ou comparables à celui du Bourget. Il devrait ainsi être possible de donner une portée plus générale à l'ensemble de mes travaux au travers d'une approche de type écologie comparée.

La plupart des résultats présentés ci-après sont publiés ou en cours de publication. Ils ont au minimum été présentés au cours de congrès nationaux et/ou internationaux. Certains de ces résultats entrent notamment dans le jeu de données de deux thèses, l'une en fin de rédaction (Ursula

DORIGO encadrée par Dominique FONTVIEILLE et Jean-François HUMBERT) et l'autre en cours (Sébastien PERSONNIC encadré par Stéphan JACQUET & Isabelle DOMAIZON).

I.2. Le lac du Bourget : un terrain « modèle »

Le lac du Bourget est une vaste coupe de montagnes tout ébréchée ou brille...
une goutte d'eau bleue comme ne l'est aucune eau dans le monde
Honoré de Balzac

I.2.1. Caractéristiques générales du lac du Bourget et de son bassin versant

Le lac du Bourget s'est formé il y a environ 19 000 ans. Il correspond aujourd'hui au reste d'un lac d'origine glaciaire plus vaste. En se retirant, les glaciers ont laissé en amont comme en aval du lac, des espaces plans mal remblayés : la plaine de la Leysse en amont, le marais de la Chautagne et de Lavours en aval. La vallée du Bourget a donc été sur-creusée et partiellement déblayée de son remplissage molassique, puis comblée lentement par les alluvions apportées par ses affluents. Le fond du lac est constitué d'une couche d'environ 200 m de sédiments fins reposant sur un substratum molassique. Depuis le début de l'ère chrétienne, le lac du Bourget et la Chautagne se sont exhaussés de près de 3 mètres, et aujourd'hui encore, ce processus s'effectue à la vitesse de 15 cm par siècle (Bravard 1987). La nature essentiellement calcaire du substrat géologique du bassin versant conditionne la composition des eaux, bicarbonatés et calciques.

Le lac du Bourget constitue le plus grand lac naturel, entièrement français (44,5 Km^2 et 3,6 milliards de m^3 d'eau). Il est situé dans les Alpes (Savoie) à une altitude de 231,5 m, orienté selon un axe nord-sud, avec une longueur maximale de 18 Km, une largeur maximale de 3,4 Km et une profondeur maximale de 145,4 m (profondeur moyenne de 81 m d'après les derniers relevés bathymétriques réalisés par l'IFREMER en 1996). La partie la plus profonde du lac, à partir de l'isobathe 140 m, forme une plaine centrale de 430 ha (soit le dixième du lac) où la dénivellation ne dépasse pas 5,4 m (**Figure 2**). On divise le lac en deux sous bassins, celui du nord (145,4 m) et celui du sud (109 m) séparés par un replat de 110 m de profondeur correspondant au prolongement du delta torrentiel d'un de ses affluents (le Sierroz). La baie de Grésine à l'est constitue un bassin secondaire profond de 46,6 m, séparé du lac par un haut fond de profondeur 33 m. Sur la rive ouest, entre Bourdeau et Hautecombe, le talus plonge avec une pente relativement abrupte de 60% quasiment constante jusqu'à la profondeur de 100 m.

Le lac reçoit principalement trois rivières, la Leysse (68% des apports) au sud qui traverse la commune de Chambéry, le Sierroz (14% des apports) et le Tillet à l'est qui traverse la commune d'Aix-les-Bains. La Leysse prend sa source à 1180 m d'altitude dans les Bauges, au nord-est de

Chambéry, et est l'affluent principal du lac qu'elle atteint après un parcours long de 40 Km. Son régime est torrentiel et son débit moyen est de l'ordre de 8,5 $m^3.s^{-1}$ mais il peut s'élever jusqu'à 100 $m^3.s^{-1}$ en période de forte crue. La Leysse a édifié un petit delta à l'angle sud-ouest de la nappe d'eau. Le débit moyen du Sierroz, de régime similaire à celui de la Leysse, est de l'ordre de 3,5 $m^3.s^{-1}$ et peut atteindre 30 $m^3.s^{-1}$ en période de crue. Il descend de la partie nord de la montagne de la Cluse, au nord-est d'Aix les Bains. Son delta est beaucoup plus grand que celui de la Leysse et c'est sans doute un prolongement sur le fond du lac qui a déterminé la formation des deux bassins évoqués plus haut. Le Tillet, enfin, est plus petit, au cours paisible et il provient des marais de Sonnaz et Méry, au sud d'Aix. Il déverse ses eaux dans le petit port. La durée de renouvellement des eaux du lac est de l'ordre de 7 ans pour un volume de 3,6 milliards de m^3. Ce chiffre a été récemment remis en cause et le temps de séjour serait en fait plus long (11 à 12 ans), de part les travaux de réaménagement à l'exutoire. Le lac se déverse au nord dans le Rhône par le canal de Savière (3,5 Km), en bordure du marais de Chautagne, 10 mois sur 12 avec un débit moyen de 25 $m^3.s^{-1}$. Faute d'une pente suffisante, le cours de cet émissaire se renverse lorsque le Rhône est en crue : le niveau du lac s'élève alors et les apports de la Leysse peuvent amplifier ce mouvement qui atteint parfois plusieurs mètres. Ce phénomène se produit généralement lorsque la fonte printanière des neiges coïncide avec une phase pluvieuse. Historiquement, le canal de Savière a été creusé au $19^{ème}$ siècle pour établir le contact entre le lac et le Rhône afin d'amortir les crues du Rhône.

Le bassin versant du lac du Bourget couvre une superficie totale de 560 Km^2 (hors lac) et ses altitudes maximale et moyenne sont respectivement de 1845 et 700 m. Il est principalement constitué de terrains sédimentaires carbonatés et l'occupation du sol varie spatialement de façon importante, du totalement rural au totalement urbain. Dans le détail et d'un point de vue géomorphologique, le bassin versant du lac du Bourget est constitué d'un bassin versant Nord rhodanien molassique fournissant un cortège argileux riche en illite et un bassin versant sud à substratum calcaire caractérisé par des smectites. Sur la base de ces observations, l'évolution du cortège argileux (rapport Smectite/illite) ainsi que de l'évolution inframillimétrique de la lamination montrent que le lac du Bourget est un excellent enregistreur de l'évolution climatique récente. La population vivant sur le bassin versant fluctue entre 170 000 et plus de 200 000, l'été. Le bassin versant de la Leysse est le principal sous-bassin du lac du Bourget de par son envergure. Il représente près de 60% de la superficie totale du bassin versant, soit environ 320 Km^2 dans la partie sud. Le sous-bassin du Sierroz à l'est représente 140 Km^2, celui du Tillet au sud-est environ 40 Km^2 et enfin au nord celui du Canal de Savière et celui des Apôtres, 55 Km^2.

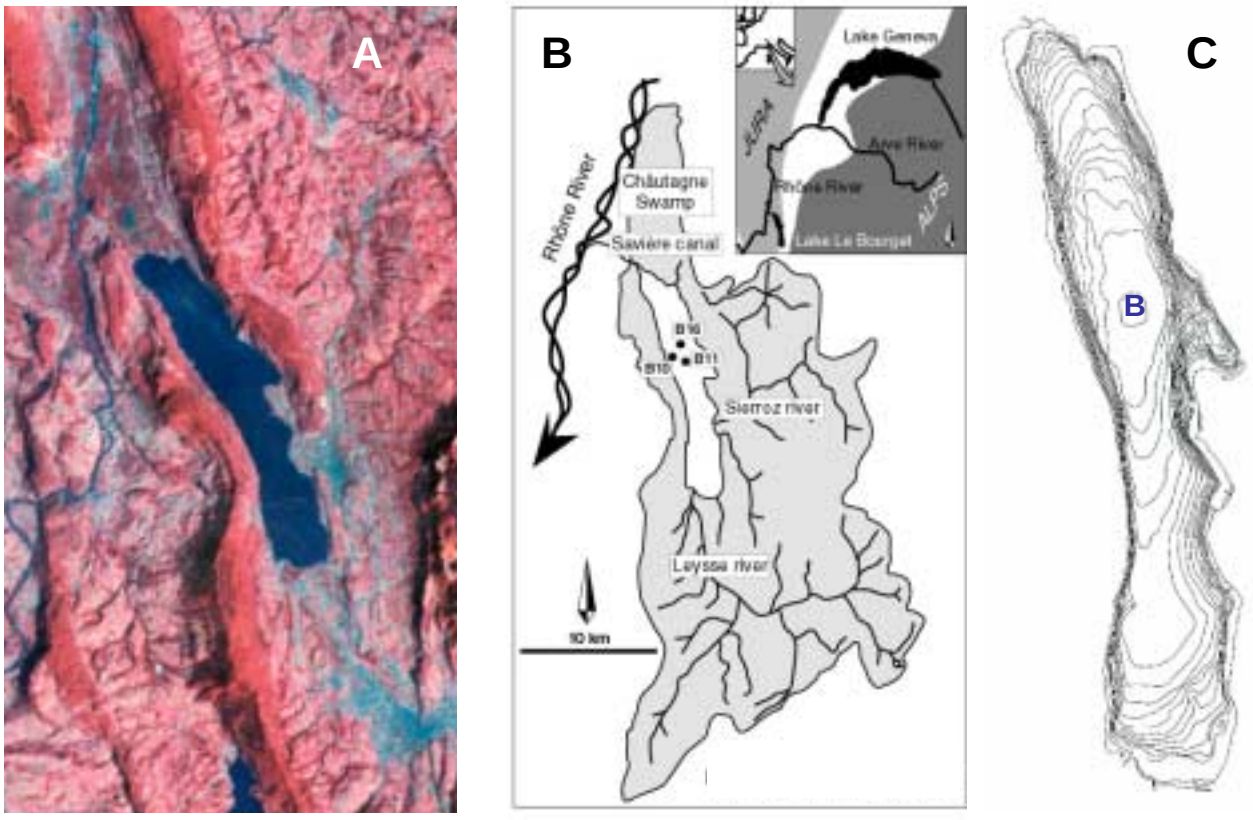


Figure 2 : Vues satellitaire (A) et schématisé (B) du lac du Bourget et de son bassin versant. La dernière carte du lac (C) fait apparaître sa bathymétrie dont l'important plateau autour du point B au-delà des 140 m.

I.2.2. Qualité des eaux et biologie du lac du Bourget

Au cours des années 1970, de grands travaux ont été réalisés par les communes du bassin versant afin d'assainir le Lac du Bourget en proie à l'eutrophisation. Cette pollution se manifestait en surface par un excès de matières organiques vivantes (typiquement les microalgues) qui, se déposant ensuite au fond, absorbaient une grande quantité de l'oxygène dissous, au détriment de la faune piscicole et plus globalement de la qualité des eaux. Ces travaux ont été effectués, avec l'aide de l'agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, pour lutter contre le processus d'eutrophisation du lac du Bourget, car dès 1972 une étude approfondie révélait que la seule construction de stations d'épuration ne serait pas suffisante pour stopper le problème et encore moins l'enrayer. La solution choisie fut celle de rejeter dans le Rhône au moyen d'une galerie percée dans la montagne du chat toutes les eaux traitées par les stations d'épuration des agglomérations du Bourget du lac, d'Aix les Bains et de Chambéry. Ce projet devenu réalité entre 1974 et 1979 a permis par détournement des eaux usées de diminuer de 50% les apports en phosphore et de 70% les apports en azote en deux décénies (**Figure 3**). Dans les années 1990 (1991 et 1993 notamment), de nouvelles stations d'épuration ont été mis en fonctionnement (à Sierroz et Bourget du lac) et certaines considérablement améliorées (déphosphatation). Parallèlement à ces mesures qui continuent avec le

projet de développement durable « Grand lac » (voir ci-dessous), la qualité des eaux du lac du Bourget a été suivie et continue de l'être pour déterminer l'évolution du stock du phosphore et de l'azote, de la transparence des eaux, de la chlorophylle *a* totale, de la température et de l'oxygène dissous. Ce suivi dit allégé et réalisé par la Cellule Technique de l'Aquarium du Lac du Bourget depuis 1980 a été amélioré/complété au cours de deux périodes 1988-1989 et 1995-1996. L'INRA y a participé à chaque fois (**Figure 4**). Depuis 1999, la Station INRA participe à cette évaluation et l'Equipe de Microbiologie Aquatique a notamment porté une attention plus particulière ces dernières années à la prolifération d'une cyanobactérie filamenteuse toxique *Planktothrix rubescens*, bien connue localement sous le vocable de « sang des bourguignons ». En 2004-2005, notre équipe a signé un contrat d'analyse de l'évolution de la qualité des eaux du lac du Bourget avec le CISLAB (Comité InterSyndicale pour l'Assainissement du Lac du Bourget). Les conclusions majeures du dernier rapport portant sur les analyses faites en 1995-1996 étaient les suivantes :

- Les années se succèdent et ne se ressemblent pas ;
- Les évolutions de température en surface montrent des variabilités très nettes comparativement aux eaux de fond qui suivent des tendances annuelles. Les 10 premiers mètres de la surface sont fortement influencés par la température de l'air, perturbations qui peuvent jouer un rôle important sur la mise en place, le développement des populations phytoplanctoniques printanières et la sélection des espèces dominantes (**Figure 5**). Nous avons confirmé cela récemment en nous intéressant au déterminisme d'apparition et à l'efflorescence de la cyanobactérie toxique *Planktothrix rubescens* sur le lac du Bourget (Jacquet *et al.* 2005) ;
- L'augmentation de la température globale en hiver se traduit par une réoxygénation faible de l'hypolimnion puisque le brassage des eaux ne peut être que partiel. L'effet d'une mauvaise réoxygénation des couches profondes est particulièrement sensible vis-à-vis du processus d'eutrophisation puisqu'elle induit une potentialité accrue du relargage du phosphore par les sédiments. Dès les années 1960, l'étude de l'évolution des températures révèle que celle ci s'accroît. Elle est attribuée au réchauffement planétaire global qui agit défavorablement sur l'évolution du lac ;
- L'augmentation de la sous-saturation en oxygène vient corroborer l'hypothèse du remplacement des espèces phytoplanctoniques caractéristiques d'un plan d'eau en voie de réoligotrophisation ;
- De 1981 à 1996, les concentrations en orthophosphates sont passées de 120 à 30 $\mu gP.l^{-1}$ au milieu du lac, mais depuis le milieu des années 1990, cette valeur stagne, probablement en raison d'un état d'équilibre induit par la stabilisation des apports externes. La réduction des nitrates a été bien moindre, de 850 à 550 $\mu g.l^{-1}$ si bien que le rapport N/P est passé de 6,7 à

17,6, confirmant le rôle limitant et de maîtrise du P dans le processus d'eutrophisation du lac ;

- La transparence a augmenté entre 1984 et 1996, traduisant le fait que la biomasse phytoplanctonique a réagit à la diminution des apports externes. La tendance s'est toutefois inversée depuis 1996 et cela est notamment du au développement de *P. rubescens* (**Figure 4**);
- Dans les années 1995-96, le lac du Bourget a un statut méso-eutrophe au regard des concentrations en phosphore total (~30 $\mu g.l^{-1}$) et en COD (3,6 $mg.l^{-1}$), du nombre de bactéries (10^6 $cell.ml^{-1}$), de la taille des bactéries (>2 µm) et de la production bactérienne égale à 20 % de la production primaire et des espèces phytoplanctoniques répertoriés. En 2004, on peut dire que le lac du Bourget est mésotrophe (suivant les critères de l'OCDE avec 25<P<30 $\mu g.l^{-1}$). Il est en phase de réoligotrophisation depuis la fin des années 80 ;
- Le lac est assujetti à de forts flux de sédimentation de matière particulaire surtout minérale. Mais le phosphore sédimente en association avec des détritus organiques. La calcite représente le constituant majeur de la matière sédimentée dans le lac du Bourget.

Pour mémoire, il est rappelé ci-dessous les critères de l'OCDE pour évaluer le degré trophique d'un lac :

Catégorie trophique	**P tot (µg/l)**	**Chl *a* moy (µg/l)**	**Chl *a* max (µg/l)**	**Secchi max (m)**	**Secchi min (m)**
Ultra-oligotrophie	<= 4	<= 1	<= 2.5	≥ 12	≥ 6
Oligotrophie	<= 10	<= 2.5	<= 8	≥ 6	≥ 3
Mésotrophie	10-35	2.5 – 8	8 – 25	6 – 3	3 – 1.5
Eutrophie	35-100	8 – 25	25 – 75	3 – 1.5	1.5 – 0.7
hypereutrophie	≥ 100	≥ 25	≥ 75	<= 1.5	<= 0.7

Au tout début de l'année 2006, nous pourrons établir un nouveau bilan puisque notre équipe a été mandatée par le CISALB avec la cellule technique du Bourget pour l'étude de l'évolution de la qualité des eaux du lac du Bourget sur les années 2004-2005. Ce dossier est porté par Jean-François HUMBERT et moi-même et je rappelle ici que je suis le responsable scientifique des campagnes de prélèvement qui ont lieu sur le lac du Bourget (voir l'autre document).

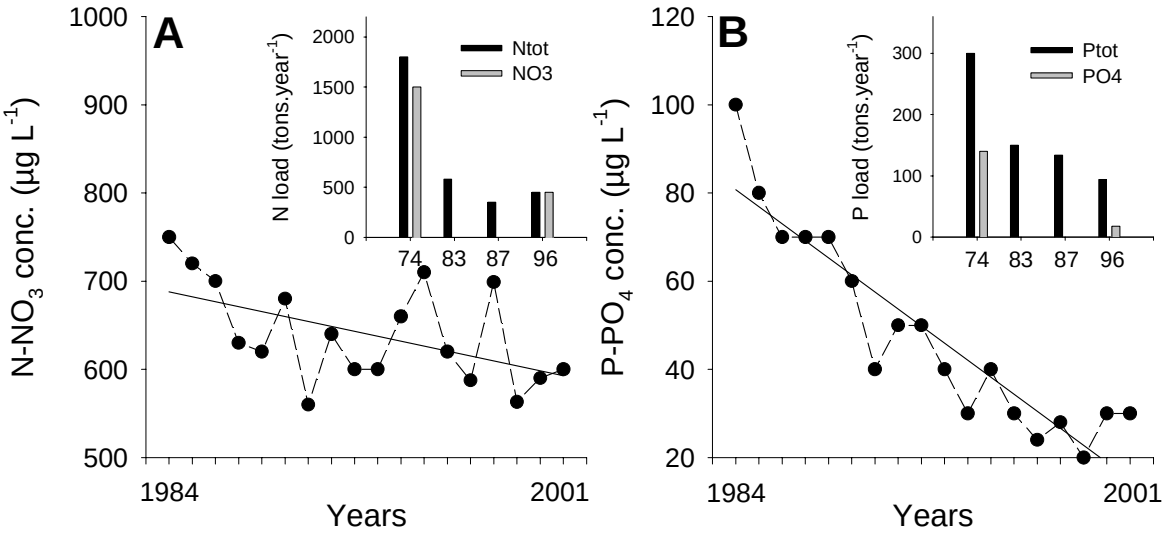


Figure 3 : Evolution des concentrations moyennes annuelles en nitrates (A) et phosphates (B) du lac du Bourget entre 1984 et 2001. Les deux encarts révèlent l'évolution des apports d'azote et de phosphore dans le lac par la Leysse et le Sierroz entre 1974 et 1996. Figure extraite de Jacquet et al. 2005.

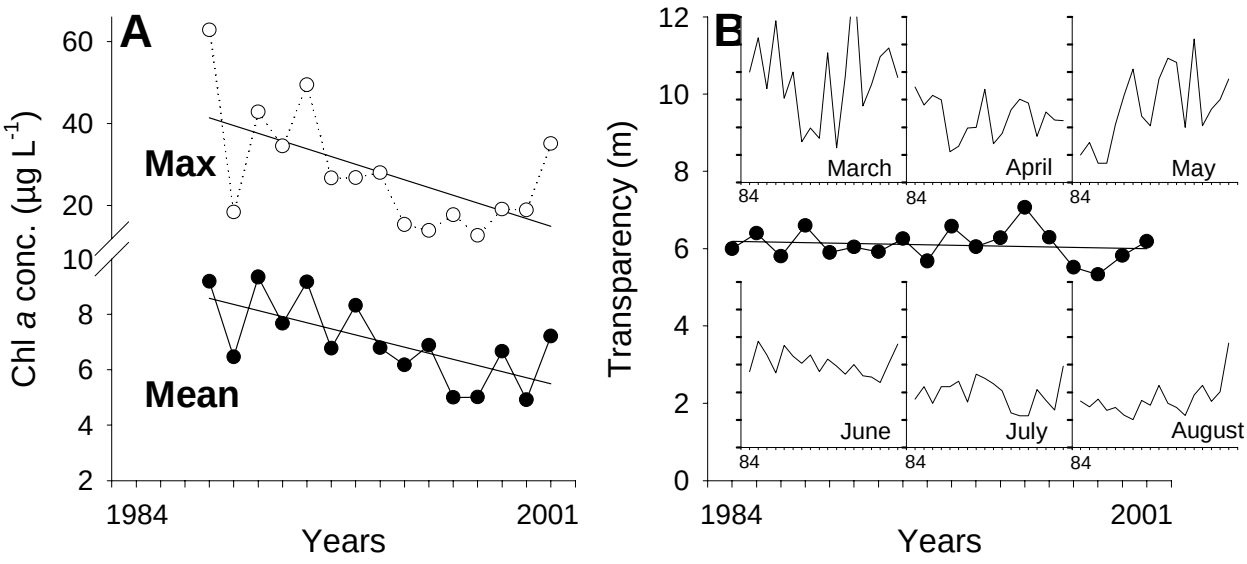


Figure 4 : Evolution des concentrations moyennes et maximales annuelles en chlorophylle *a* (A) et de la transparence des eaux du lac Bourget entre 1984 et 2001. Pour la transparence, l'évolution est également donnée en fonction des mois. Figure extraite de Jacquet et al. 2005.

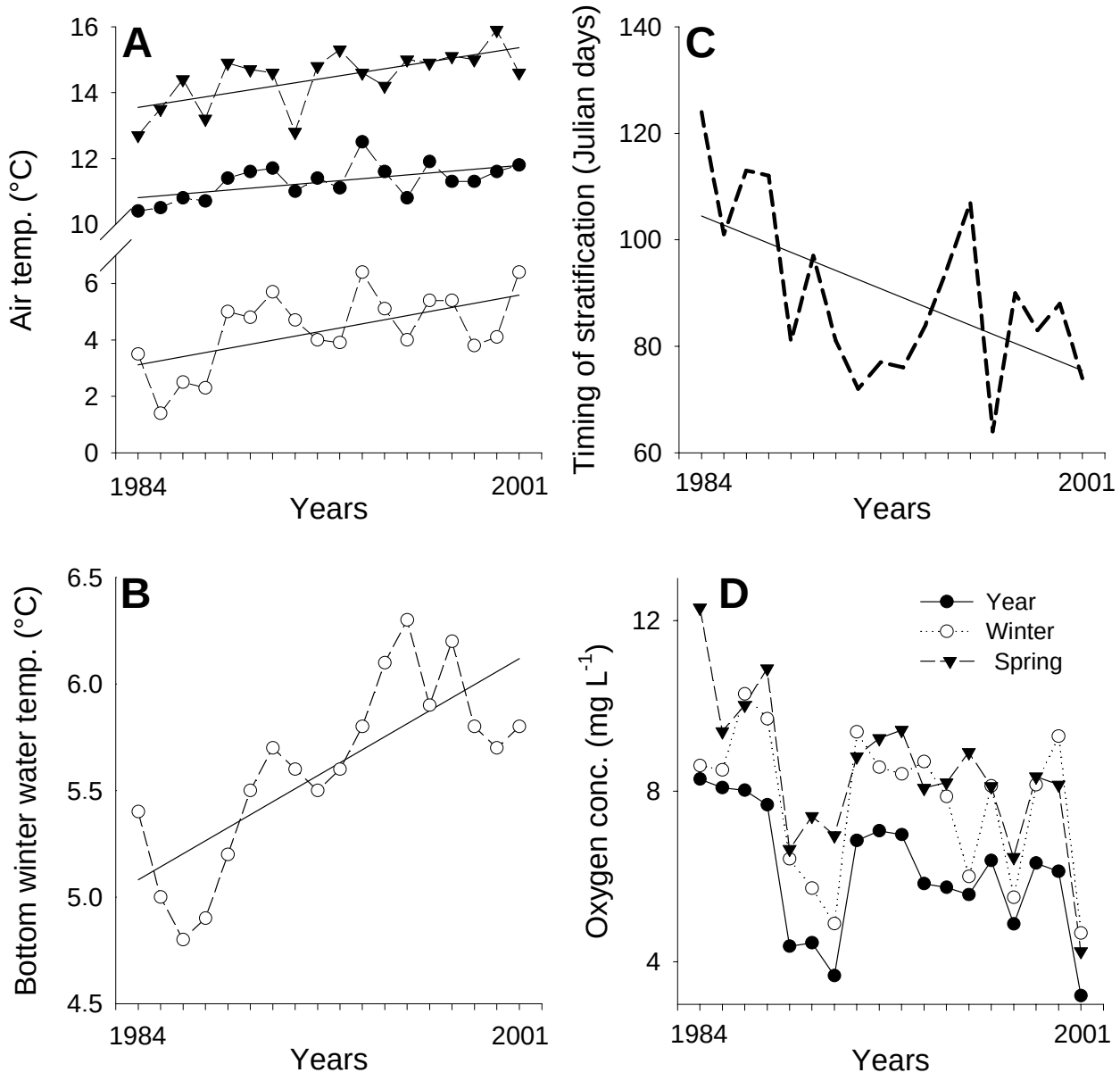


Figure 5 : Evolution annuelle et/ou hivernale et printanière des températures de l'air (A), de l'eau au fond du lac (B), du démarrage de la stratification thermique (C) et des concentrations en oxygène dissous (D) entre 1984 et 2001. Figure extraite de Jacquet et al. 2005.

I.2.3. Le lac et ses usages

Le lac du Bourget, joyau naturel de la Savoie, constitue une réserve potentielle en eau potable très importante (égale à la consommation domestique française sur un an). Aujourd'hui, environ 30 000 $m^3.j^{-1}$ sont pompés directement dans le lac pour alimenter les municipalités de

Tresserve, Aix-les-Bains et Hautecombe. Ce site exceptionnel, qui a inspiré poètes et auteurs (Lamartine, Hugo, Balzac), attire de nombreuses personnes :

- natation : plus de 450 000 personnes se rendent sur les plages ;
- sports nautiques : aviron, voile, ski nautique, planche à voile, plongée ;
- navigation de plaisance : avec environ 2 500 places d'amarrage
- autres activités : cyclotourisme, promenade, escalade, pêche amateur, etc

L'impact touristique sur les activités économiques est très important principalement dans le secteur commercial. Par exemple, la pêche professionnelle est très dynamique : 80 tonnes de poisson sont attrapés par an en moyenne générant un chiffre d'affaire de 300 000 Euros, valorisé dans les nombreux restaurants locaux.

Le lac et son bassin versant subissent également une forte pression démographique croissante depuis 30 ans (+ 60%). La région du lac attire, dans un espace restreint la moitié de la population du département de la Savoie. De plus, il est situé sur un axe international de circulation entre l'Europe du Nord et l'Italie.

Les principaux risques de pollution pour les eaux du bassin versant et du lac du Bourget sont :

- les rejets domestiques et industriels ;
- les pollutions diffuses d'origines agricole et urbaine ;
- les pollutions accidentelles liées aux infrastructures de communication.

On comprend mieux dès lors tout l'intérêt de l'étudier et de protéger de toutes ces agressions externes. C'est l'ambition du projet grand lac résumé ci-dessous.

I.2.4. Le projet grand lac : aménagement et développement du pays du lac du Bourget

Le lac du Bourget et sa région avoisinante jouissent d'une politique locale exceptionnelle en terme d'aménagement, de développement et de protection régionale. Le contrat de bassin versant n'a pas été le fruit d'une soudaine et brutale prise de conscience. De nombreuses initiatives ont été prises depuis 25 ans avec des résultats très probants. Toutefois, si l'aménagement du territoire prend davantage en compte les enjeux de la gestion durable de la ressource en eau, il n'en est pas de même pour les milieux aquatiques. Ainsi, alors que la qualité des eaux du lac du Bourget s'améliorait à partir de la fin des années 80, les zones urbaines s'étendaient, asphyxiant l'espace de liberté des rivières, banalisant les zones humides et certaines rives du lac. Près de 200 réunions de travail ont été nécessaires pour assurer le pilotage des 45 études conduites dans la phase d'élaboration du contrat (montant des études: 1,47 millions d'euros). Les études préalables ont permis de :

- Caractériser les différentes pollutions (domestique, agricole, artisanale, industrielle, routière, etc.), d'en appréhender les causes et d'identifier les actions à entreprendre. A cette occasion, les schémas directeurs d'assainissement des 65 communes ont été réalisés et un programme innovant a été conçu pour maîtriser les pollutions d'origine artisanale et industrielle.
- Dresser l'état des écosystèmes aquatiques (rivières, zones humides et lac), d'évaluer les travaux de restauration, d'entretien et de gestion nécessaires pour garantir durablement leur diversité biologique.
- Apporter des éléments de réponses aux problématiques sanitaires récemment apparues (cyanobactéries et dermatite cercarienne).
- Elaborer une stratégie de communication et d'actions pédagogiques en direction des scolaires.

Les enjeux pour le lac sont bien sûr de garantir une qualité d'eau compatible avec les usages et fonctions qui lui sont associés. Il s'agit également d'assurer à la zone littorale un équilibre durable entre activités humaines et espaces naturels. Les enjeux pour le bassin versant sont l'eau, sa qualité et sa quantité, et les milieux aquatiques. Dans ces domaines, beaucoup reste à faire. Les solutions à mettre en œuvre viseront à reconquérir des axes de vie en rivières, à préserver, restaurer et gérer les zones humides, à garantir le développement autonome de la faune indigène et enfin, à assurer la protection des personnes et des biens contre les crues. Fort de cette analyse, le comité de bassin versant du Lac du Bourget a défini, pour les quatre thèmes généraux suivants, des objectifs qualitatifs et quantitatifs :

- Réduire les flux de pollution pour améliorer la qualité de l'eau.
- Restaurer, entretenir et gérer les écosystèmes aquatiques.
- Réduire l'exposition des personnes et des biens vis-à-vis des crues.
- Gérer de manière concertée et durable en associant la population et en évaluant les actions conduites.

Le SDAGE Rhône-Méditerranée-Corse a servi de fil directeur à la conception du dossier « Grand Lac ». Un an de concertations et de négociations a été nécessaire pour bâtir un programme techniquement cohérent, financièrement viable et géographiquement équitable. Les acteurs du bassin versant - élus, techniciens, agriculteurs, artisans, commerçants, industriels, pêcheurs, chasseurs et protecteurs de la nature – se sont investis avec dynamisme et passion dans l'élaboration du programme d'actions. Au terme de ce travail, c'est un contrat de près de 122 millions d'euros qu'il a été proposé de conduire sur une durée de 7 ans. En résumé, l'an 2000 aura donc vu la création du projet de développement durable intitulé « Grand Lac » : vaste chantier écologique, pari humain et défit économique soutenu par les 60 communes du bassin versant du lac du Bourget.

…

Ô lac ! Rochers muets ! Grottes ! Forêt obscure !
Vous que le temps épargne ou qu'il peut rajeunir,
Gardez de cette nuit, gardez, belle nature,
Au moins le souvenir !

Qu'il soit dans ton repos, qu'il soit dans tes orages,
Beau lac, et dans l'aspect de tes riants coteaux,
Et dans ces noirs sapins, et dans ces rocs sauvages
Qui pendent sur tes eaux !
…
Ô temps, suspend ton vol !
Lamartine

I.2.5. Revue de la littérature

I.2.5.1. Revue sur les travaux ayant porté sur la biologie et le statut trophique du lac du Bourget. Cadrage.

Le lac du Bourget n'a été à ce jour que très peu étudié du point de vue de sa biologie et il suffit de consulter les bases AFSA (*Aquatic Fisheries and Aquatic Sciences*) pour s'en rendre compte avec moins de 20 références où le mot clef 'Lac du Bourget' ou Lake Bourget' ou Lake of Bourget' apparaît. En affinant la recherche au domaine qui nous intéresse, à savoir la biologie et l'écologie microbienne, avec des mots clefs comme 'bacteria' ou 'cyanobacteria' ou 'microbial loop', le nombre de références tombe à moins de 10. Il existe en fait un nombre important d'ouvrages (rapports, diplômes, enquêtes) appartenant à la littérature grise ou non recensés dans les bases internationales et donc finalement très peu d'articles scientifiques internationaux de rang A.

Chronologiquement, c'est Forel (1884) qui établit une première liste des espèces présentes dans le lac du Bourget. Il faut attendre 1904 pour que Magnin propose et dresse la première liste des végétaux (plancton exclu) et cartographie les zones de végétation tout autour du lac. Avant lui, Le Roux (1891) cite des valeurs de transparence de 11,5 m en avril et met en avant la limpidité des eaux du lac du Bourget. La première référence au plancton concerne les diatomées qui sont listées mais non comptées par Prudent en 1907. Suivent 5 et 12 ans plus tard une liste et la description de formes zooplanctoniques, les cladocères (Eynard 1912, Vandel 1919). En 1920, Eynard publie la liste des espèces de cladocères trouvés dans le lac du Bourget. Kreitman (1924) évoque pour la première fois le caractère introductif de l'omble et autochtone des corégones du lac du Bourget. La description des corégones et de leur acclimatation du lac du Bourget suivra en 1927 (Kreitman, Chevey). En 1926, puis en 1937, Pelosse s'intéresse à d'autres espèces zooplanctoniques (notamment les entomostracés) mais c'est Vivien la même année qui dresse une liste des espèces

principales de zoo- et de phytoplancton et de leurs variations quantitatives, notamment des diatomées *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*, *Tabellaria fenestrata* et *Synedra acus*. Le lac peut alors être décrit comme oligotrophe mais il est intéressant de noter que Leroux rapporte dès 1928 la présence de *P. rubescens* en hiver. Vivien complète sa liste en 1940 avec les espèces de poissons (les corégones et l'omble-chevalier apparaissent alors originaires du lac). Si, dès la fin du 19ème siècle, des mesures chimiques ont été proposées par Delebecque & Duparc (1892), Chodat (1898) et encore Delebecque (1898), il faut attendre 1943 (Hubault) pour l'obtention de chiffres rapportant la présence de Phosphore (22 $\mu g.l^{-1}$) dans les eaux du Sierroz (due aux rejets des abattoirs d'Aix-les-Bains), des eaux profondes riches en oxygène dissous (9,1 $mg.l^{-1}$ à 105 m) à toutes les époques de l'année, ou encore l'absence de fer et d'acide phosphorique dissous. A cette époque, le lac est toujours oligotrophe et ses eaux très peu polluées. Vivier (1945) décrit une nouvelle fois les variations du plancton pélagique du lac du Bourget. En 1947, Hubaut propose la première étude complète sur la chimie, physique et biologie du lac du Bourget. Les paramètres mesurés sont les suivants: CO_2, alcalinité ($CaCO_3$), CaO, silice, P et Fe au fond, température, transparence, pH, O_2 (qui révèle une sursaturation dans les dix premiers mètres en octobre 1935 et en août 1937 et il n'y a qu'une faible désoxygénation au fond), l'azote nitrique, le Phosphore (aucune trace encore dans les eaux du lac !) et la liste des espèces du plancton avec les diatomées (*Fragilaria crotonensis, Asterionella formosa*, *Tabellaria fenestrata*), les organismes de fond et la liste des poissons (le Poisson-chat introduit est devenu nuisible, la truite est peu abondante, l'Omble-chevalier indigène est en régression à cause de la pêche, le lavaret est stable mais trop pêché, la perche est en pleine expansion). Le lac est encore oligotrophe grâce à la rive occidentale abrupte et donc inhabitée mais Hubault s'inquiète déjà des conséquences à venir de l'augmentation des rejets d'Aix-les-Bains. 1950 est l'année où Dottrens décrit avec précision la morphologie et l'écologie du lavaret du lac, à ne pas (plus) confondre avec la Bondelle ou jeune palée. En 1953, Bourrelly détaille la liste du phytoplancton avec la fréquence pour chaque espèce (*Asterionella formosa*, *Tabellaria fenestrata* et *Fragilaria crotonensis* sont présentes en grande quantité ainsi que *Dinobryon sertularia* et *Ceratium hirundinella*). Le lac est oligotrophe et il y a toujours de l'oxygène dans les eaux profondes. Toutefois, l'espèce *Peridinium volzii* devient dominante dans le lac du Bourget et cette espèce est caractéristique des milieux eutrophisés. Un premier signe sans équivoque ? C'est en 1955 que les statistiques de pêche professionnelle situent la chute des captures des deux espèces de salmonidés: le lavaret et l'omble-chevalier. Batias en 1958 rapporte que le phytoplancton est plutôt pauvre (en raison du nombre peu élevé d'espèces). Par contre, il est fait mention dès 1956 de l'apparition de la cyanobactérie *Planktotrix (Oscillatoria) rubescen*s, signe d'eutrophisation. Avant cette date, elle n'était que sporadique bien que Balland en 1976 rappelle un développement spectaculaire de *P. rubescens* en 1951, mais qui ne semble pas avoir alerté les foules de l'époque ! Quant aux poissons,

les salmonidés (corégone, omble, truite) prédominent. Le lac est toujours considéré comme oligotrophe en raison de peu de sels chimiques, pas de matières organiques, beaucoup d'oxygène, peu de CO_2 et peu de P. A partir de 1960, un effort a été consenti par les communes du bassin versant concernant le réseau d'assainissement et les stations d'épuration pour diminuer les apports des fertilisants. En 1966, Laurent rapporte l'apparition de cause inconnue de la microalgue *Mougeotia*. Le lac est déclaré comme très eutrophe à partir de 1970 par Laurent et en 1976 par Couturier avec une situation qui continue toujours à évoluer dans le sens d'une aggravation. La transparence de l'eau a chuté en moyenne de 7,4 à 4 entre 1933/37 et 1972, le déséquilibre entre les couches superficielles et profondes s'accroît [les couches de surface sont suroxygénées en raison de la production phytoplanctonique alors que les eaux de fond sont de plus en plus désoxygénées], le lac est dangereusement atteint par l'augmentation des teneurs en sels nutritifs, le plancton végétal est essentiellement caractérisé par les cyanobactéries *Aphanizomenon flos-aquae* et *Microcystis aeruginosa* et les diatomées *Fragilaria crotonensis* et *Melosira granulata* (Laurent & Balvay 1972). 1966 est aussi l'année où Michel présente ses recherches sur la faune benthique du lac et où il étudie la forme et la répartition de la cyanobactérie benthique *Microcystis farlowiana*. Toujours en 1966 puis en 1967, David donne déjà une vision très pessimiste sur la pêche, les pêcheurs professionnels et la pollution dans le lac du Bourget. En 1978, Pelletier en comparant la production primaire des lacs Léman d'Annecy, de Nantua et du Bourget rapporte pour les années 1974-1976 des valeurs de production phytoplanctonique très élevées, s'accompagnant de valeurs de transparence faibles allant dans le sens du processus d'eutrophisation. Si l'on s'arrête à la fin des années 1970, le lac est donc signalé comme étant oligotrophe jusqu'en 1958 et le passage de l'état oligotrophe à l'état eutrophe semble s'être opéré dans les années 60, en raison de l'urbanisation croissante de ses rives et affluents. Le maximum sera atteint dans les années 80, au même moment du détournement des eaux usées vers le Rhône par la galerie de l'épine (12,5 Km de galerie sous la Montagne du Chat) au sud du lac et la mise en place de stations d'épuration (et notamment de déphosphatation). Mais au cours des années 50, on observe l'apparition de signes caractéristiques de l'eutrophie. D'après les données paélominologiques issues de carotte du lac du Bourget, Arnaud et ses collègues (2004) laissent entrevoir que les premiers signes d'eutrophisation sont apparus vers 1942. Il est à noter qu'une nouvelle carotte issue de la baie de Grésine en juin 2004 semble montrer que la date charnière et visible à l'état eutrophe est 1947 (Poulenard, communication personnelle). En 1976, le lac est « très eutrophe ». L'état eutrophe n'est donc pas naturel pour le plus grand lac naturel entièrement français, et les efforts consentis pour lui rendre son état oligotrophique d'origine ou de référence, bien que difficile à évaluer, sont parfaitement justifiés.

Dans les années 1970 et 1980, le caractère eutrophe du lac se manifeste par l'évolution vers la structure suivante : beaucoup de microalgues, une désoxygénation des eaux de

fond pouvant aller jusqu'à l'anoxie de l'hypolimnion, une faune piscicole abondante avec disparition des espèces nobles au profit d'autres de moindre valeur économique. La mise en place du détournement des eaux usées dans le sud du lac va favoriser la réduction des apports en nutriments au lac et entre 1981 et 1995, une augmentation de la transparence moyenne des eaux de 2,8 à 4,8 m est enregistrée, traduisant la diminution de la biomasse phytoplanctonique. Dans le même temps, la désoxygénation du fond du lac diminue également. Par contre, les peuplements phytoplanctoniques changent et la biomasse reste à peu près équivalente (Vinçon-Leite et al. 2002, Jacquet et al. 2005). En 1995-96, 162 taxons phytoplanctoniques ont été identifiés (rapport CERGRENE). Parmi eux, les cyanobactéries représentent 13 taxons. Si elles se rencontrent presque toute l'année on observe au cours de l'étude 1995-96 deux pics importants pour *O. limnetica* et *A. flos aquae*. En 1996, on remarque un développement durable et important *d'O. rubescens*. Il est à noter que par rapport aux études des années antérieures, *M. aeruginosa* n'est plus présente dans le phytoplancton du lac. Il est écrit dans le rapport que les cyanobactéries présentes en août 1995 se développent considérablement pendant l'été 1996 et l'importance prise par *P. rubescens* indique le caractère eutrophe du lac du Bourget. En 1996, les deux espèces principales sont des filamenteuses, une algue verte *Mougeotia gracillima* (25% des espèces présentes) et *P. rubescens* (22%). Ainsi, depuis 1996, la cyanobactérie toxique *P. rubescens* connaît des efflorescences régulières alors que ce n'était pas le cas entre 1983 et 1995 (Oberhaus et al. 2004). Dans un article publié dans *Harmful Algae*, nous avons proposé une explication de la raison du développement, à première vue paradoxale, de cette cyanobactérie dans cet écosystème en voie de restauration qu'est le lac du Bourget (Jacquet et al. 2005). Brièvement, le succès de cette cyanobactérie qui commence son développement au niveau du métalimnion serait due à l'augmentation des transparences de la colonne d'eau et une plus grande durée de la stratification thermique enregistrée durant ces 10-20 dernières années (voir chapitre IV de ce document). Avant *P. rubescens*, Michel et al. (1995) rapporte quelques aspects de l'implantation d'une autre cyanobactérie potentiellement toxique *Microcystis farlowiana*, répertoriée pour la première fois en 1949 par Bourrelly, trouvée en de nombreux points et en grandes quantités dans le lac du Bourget sans qu'on s'en explique véritablement la raison. Curieusement, aucune autre étude ne s'est intéressée à cette cyanobactérie depuis. Le processus de restauration s'est donc déroulé relativement rapidement de 1980 à 1990 puis s'est considérablement ralenti. Aujourd'hui le statut du lac du Bourget est de type mésotrophe expliquant encore le succès d'espèces efflorescentes. L'étude lourde 95-96 a aussi fait le recensement des espèces zooplanctoniques (64 taxons de rotifères [*Keratella cochlearis*, *K. quadrata*, *Kellicotia longispina*], 12 taxons de cladocères [*Daphnia hyalina*, *D. longispina*, *D. galatea*, *Bosmina longirostris*], 8 taxons de cyclopoïdes [*Cyclops prealpinus*], 3 espèces des calanoïdes [*Eudiaptomus gracilis*]). Tassin et Vinçon-Leite (1998) sont les premiers en 1998 à tenter l'élaboration d'un modèle de prédiction d'évolution de la qualité des

eaux du lac du Bourget après la modélisation de sa structure physique (Vinçon-Leite et al. 1995) et son application a commencé à être démontré avec le projet SACYTOX (http://www.sacytox.org), projet auquel notre équipe a été directement impliqué. En fait, mon recrutement a été fortement lié à ce projet puisqu'il s'agissait pour moi d'expliquer le déterminisme d'apparition et de maintien de l'efflorescence à *Planktothrix rubescens* dans le lac du Bourget. C'est aujourd'hui chose faite (Jacquet et al. 2005).

Si le plancton et les poissons en général ont eu la faveur des périodiques scientifiques, ils ne sont néanmoins pas les seuls et récemment on pouvait lire dans la revue 'Biologia' les résultats d'essai de réintroduction de la tortue européenne *Emys orbicularis* après deux années de suivi (Cadi & Miquet 2004). Cette même année 2004, Snable et ses coauteurs publiaient dans la revue de recherche en parasitologie l'analyse allozyme du polymorphisme et de la variation génétique chez deux cestodes de la famille des Pseudophyllidea, *Eubothrium salvelini* et *E. crassum***.** Concernant le domaine piscicole, il existe de nombreux rapports portant sur l'évaluation des pratiques de repeuplement piscicole. Alexis Champigneulle, Ingénieur de Recherche à la Station INRA a beaucoup œuvré en liaison avec les orientations d'appui à la gestion des pêcheries et d'évaluation des repeuplements et réhabilitation des populations et des pêcheries de salmonidés. En 2004, le suivi des populations d'omble et de corégone soumises à pacage lacustre au lac du Bourget a été publié (Champignuele & Cachera 2004). Avant cela, l'état des prélèvements par pêche à la traîne sur le lac du Bourget, entre 1995 et 2000, avait été mis en avant (Janody 2000). Ces différents rapports révèlent :

- une augmentation de la participation des pêcheurs amateurs à la gestion de la ressource pisciaire par retour des carnets de pêche ;
- la pression de pêche amateur reste relativement constante ;
- une tendance globale à la diminution des prises de salmonidés et à l'augmentation de celles de brochets, perches et sandres

Une très bonne publication par Champigneulle & Cachera (2003) a aussi permis de révéler l'efficacité du stockage sur un an des jeunes truites (*Salmo trutta L.* et *Oncorhynchus mykiss W.*) afin de servir la pêche professionnelle et amateur à partir de bateaux pour le lac du Bourget.

S'il n'a été uniquement question dans ce paragraphe que de biologie, je tiens à signaler que le lac du Bourget a été et continue à être beaucoup étudié par les paléo-climato-limnologues et il faut citer le laboratoire EDYTEM de l'Université de Savoie qui fait dans ce domaine un travail remarquable. La thèse de Fabien Arnaud, soutenue en 2003, a notamment porté sur la signature climatique et anthropique dans les sédiments holocènes du lac du Bourget, c'est-à-dire la période géologique la plus récente débutée il y a environ 11 000 ans. A partir de carottes

sédimentaires longues de 9 à 13 mètres et du signal détritique observé dans ces dernières, il a été notamment mis en évidence une tendance à long terme vers l'augmentation de la fréquence et/ou de l'intensité des débordements du Rhône dans le lac du Bourget. L'auteur propose que cette tendance pourrait retranscrire la tendance à long terme du climat holocène vers une accentuation des vents d'ouest, porteurs d'humidité, aux moyennes latitudes d'Europe occidentale en réponse à l'augmentation de l'insolation hivernale dans les zones tropicales de l'hémisphère nord. Les conséquences sur la biologie ont déjà été remarquées (voir plus bas).

Notons enfin qu'un livre vient d'être publié sur le lac du Bourget, aux éditions '*La Fontaine de Siloé*', écrit par Raymond CASTEL & Elizabeth ANDRE, où il est surtout question d'archéologie: *Le lac du Bourget: 50 ans de recherches archéologiques, 5 000 ans d'histoire*

I.2.5.2 Revue sur la boucle microbienne du lac du Bourget avant mes travaux

Rappelons rapidement que des relations trophiques complexes s'établissent entre les organismes au sein des écosystèmes aquatiques. L'une des voies de transit des flux d'énergie et de matière est la chaîne trophique dite classique basée sur la succession phytoplancton – zooplancton - poissons (Femchel 1988). La boucle microbienne, dont le concept a été introduit par Pomeroy (1974) et reformulé par Azam et al. (1983), est une seconde voie de circulation, parallèle et imbriquée à la première, des flux vers les niveaux trophiques supérieurs qui implique bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries, protistes flagellés et ciliés.

Comme nous l'avons dit plus haut, le nombre de travaux portant sur la boucle microbienne du lac du Bourget est extrêmement limité. 5 références sont répertoriées dans les bases de données *AFSA* et *ScienceDirect*. Il est intéressant de noter que dans le rapport du dernier suivi lourd du lac de Bourget, on pouvait lire que dans le contexte de réoligotrophisation du lac, l'évolution d'un type d'algues vers des algues de petite taille entraîne un recyclage de la matière organique qui devient prépondérant dans les zones superficielles. Cela se traduit par une augmentation plus importante de la matière organique liée à la diminution de la vitesse de chute, et une minéralisation plus efficace. Cela laisse donc suggérer que la boucle microbienne ait un rôle de plus de plus en plus important dans ce lac comme cela a déjà été noté et démontré pour le lac d'Annecy, un lac particulièrement oligotrophe (Domaizon et al. 2003). Une des premières publications portant sur la boucle microbienne du lac du Bourget est celle de Viboud & Fontvieille (1998) qui rapporte l'évolution des effectifs et des biovolumes des populations microbiennes dans les lacs d'Annecy et du Bourget. Les auteurs montrent que les picocyanobactéries et petits flagellés sont plus importants dans le lac d'Annecy. Ils montrent aussi que la diversité calculée par l'indice de Shannon est toujours plus élevée dans le lac de niveau trophique inférieur (i.e. Annecy). Si on

s'intéresse uniquement au lac du Bourget, ces auteurs rapportent, pour la période de transition printanière de 1997 et pour les eaux de surface (2 m), que les concentrations moyennes en bactéries hétérotrophes et flagellés hétérotrophes sont de l'ordre de $2,1x10^6$ cell.ml^{-1} et 350 cell.ml^{-1} respectivement, et que les concentrations des microorganismes autotrophes, picocyanobactéries et flagellés pigmentés, sont de l'ordre de $4,7x10^3$ cell.ml^{-1} et 662 cell.ml^{-1} respectivement. En 2001, Gayte et ses collaborateurs ont rapporté le fruit de leurs travaux portant sur la dynamique du carbone organique dissous (COD) biodégradable et/ou réfractaire pour les années 1995-1996, un paramètre fortement lié à l'activité bactérienne. Ils révélaient que la grande majorité du COD était réfractaire comme c'est souvent le cas dans les lacs de statut trophique comparable mais qu'une bonne partie de carbone était originaire d'un carbone biodisponible antérieur. Au final, leurs résultats suggéraient que la quantité d'énergie véhiculée au travers de la boucle microbienne (surtout basée sur le COD biodégradable) par comparaison avec la quantité produite par production primaire était aussi variable à l'intérieur même du lac du Bourget qu'entre deux lacs de statut trophique différent.

Quelques informations très intéressantes sur la boucle microbienne du lac du Bourget peuvent aussi être trouvées dans l'unique thèse ayant porté sur cette problématique, celle de Sylvie Viboud (2003). Je retranscris ci-dessous des informations données par l'auteur. La biomasse des organismes planctoniques constitue une fraction de l'ordre de 30% du carbone organique "mobile » *(terme utilisé pour désigner la somme du carbone "potentiellement mobilisable [CODB : carbone organique dissous biodégradable] et déjà mobilisé sous la forme de la biomasse des organismes planctoniques)* alors qu'elle est souvent supérieure à 50% dans le lac Léman. Cette biomasse est essentiellement constituée par les bactéries hétérotrophes qui représentent une fraction comprise entre 1,9 et 10,7 % du carbone organique "mobile" et par celle du phytoplancton, deux à quatre fois plus élevée que celle des bactéries. Les valeurs maximales des biomasses bactériennes (11 %) et phytoplanctoniques (80 %) apparaissent en période estivale, période durant laquelle les valeurs minimales de la fraction du CODB sont observées, soit 43 % et 10,3 % du "carbone mobile" respectivement en 1995 et 1996**.** Durant la majeure partie de l'année, le carbone "mobile" se trouve donc essentiellement sous forme de CODB (en moyenne, 70 %). Cette forte proportion montre que, dans ce lac, les nutriments organiques sont en excès vis-à-vis de la biomasse bactérienne, ce qui vient à l'appui du caractère mésotrophe qui lui est attribué sur le critère de la concentration des nutriments minéraux. La valeur médiane du CODB observée au cours de deux cycles annuels est de l'ordre de 0,7 ppm avec des valeurs minimales et maximales respectivement de 0 et de 3,3 ppm. A travers le CODB, la fraction "variable" du COD se situe donc entre 2,7 % et 64,7 %. Les effectifs bactérioplanctoniques du lac du Bourget varient entre $3,7x10^5$ bact.ml^{-1} et $4,4x10^6$ bact.ml^{-1} (valeur médiane : $1,1x10^6$ bact.ml^{-1}), ce qui correspond aux ordres de grandeurs observés sur d'autres lacs

mésotrophes (Güde 1985, Weisse, 1991). La production qui est lui associée est de l'ordre 562 $mgC.m^{-2}.j^{-1}$, valeur médiane qui est plus élevée que celle observée dans le lac Léman. L'échelle des variations reste néanmoins similaire dans les deux lacs avec des valeurs minimale et maximale respectivement de 40 $mgC.m^{-2}.j^{-1}$ et 3697 $mgC.m^{-2}.j^{-1}$. La production primaire est de l'ordre de 1300 $mgC.m^{-2}.j^{-1}$, valeur médiane proche de celle observée dans le lac Léman, mais là encore, l'étendue des valeurs est plus élevée dans le lac du Bourget avec un minimum de 200 $mgC.m^{-2}.j^{-1}$ et un maximum de 5000 $mgC.m^{-2}.j^{-1}$. Le lac du Bourget est donc caractérisé par une valeur médiane élevée du rapport production bactérienne / production primaire. Ce rapport PB/PP est de 47 % alors qu'il est de l'ordre de 9,6 % dans le lac Léman pour la même période. C'est donc du point de vue des médianes de la production bactérienne, d'une part, et de l'amplitude des variations de la production primaire, d'autre part, que se manifeste la différence de niveau trophique entre les deux lacs, les valeurs de ces descripteurs étant toutes les deux plus grandes dans le lac le plus riche en nutriments.

Une comparaison plus détaillée de la composition des communautés microbiennes a été réalisée entre le lac du Bourget et deux lacs de niveaux trophiques inférieurs (oligotrophe), lac d'Annecy (Viboud 1997) et lac Pavin (Viboud 1997, Viboud & Fontvieille 1998). La comparaison entre le lac du Bourget et le lac d'Annecy effectuée durant la période printanière montre que les concentrations moyennes des bactéries hétérotrophes et des flagellés non pigmentés sont chacune supérieure dans le lac du Bourget (respectivement $2x10^6$ et 348 $cellules.ml^{-1}$). L'inverse est observé pour les picocyanobactéries, deux fois plus faibles dans le lac du Bourget ($4,7.10^3$ $cell.ml^{-1}$) et pour la concentration des flagellés pigmentés légèrement plus faible avec 662 $cellules.ml^{-1}$ dans le Bourget contre 728 $cellules.ml^{-1}$ dans le lac d'Annecy. L'abondance des organismes pigmentés et leur biomasse exprimées relativement à celles de l'ensemble des microorganismes considérés, sont plus élevées dans le lac d'Annecy (respectivement, 1,33 % et 79 %) que dans le lac du Bourget (respectivement, 0,2 % et 52 %). De façon générale, les résultats montrent que la circulation des flux de carbone passe essentiellement par la voie hétérotrophe dans le lac du Bourget, lac qui est celui dont le niveau trophique est le plus élevé.

La comparaison des communautés microbiennes entre le lac du Bourget et le lac Pavin, effectuée en période estivale, tend à confirmer ces résultats. Bien que l'abondance relative des organismes pigmentés, vis à vis de l'ensemble des organismes considérés, soit plus faible dans le lac Pavin (1,87 %) que dans le lac du Bourget (4,84 %), leur biomasse relative est plus élevée dans le lac Pavin (23 %) que dans le lac du Bourget (5,7 %). La prise en considération de la biomasse permet donc de constater que la voie hétérotrophe est plus importante dans le Bourget, contrairement à l'indication apportée par les effectifs.

Dans le lac du Bourget, c'est la biomasse des ciliés et des flagellés qui domine (79 %) celle de l'ensemble des autres microbes, ce qui laisse supposer un transfert élevé des flux de

carbone vers les niveaux trophiques supérieurs. Traduits dans le cadre des modèles proposés par Sherr *et al.* (1987), ces résultats tendent à montrer que dans ce lac, les bactéries constitueraient plutôt un lien ("link") vers les niveaux trophiques supérieurs.

En conclusion, l'ensemble des travaux de Sylvie Viboud sur la période 1995-1997 montrait pour le lac du Bourget la pertinence de plusieurs des descripteurs de la boucle microbienne pour la comparaison des lacs du point de vue de leur niveau trophique :

- le rapport PB/PP qui marque nettement leurs différences avec une valeur médiane de 47 % dans le lac du Bourget et seulement 9,6 % dans le lac Léman ;
- la part prise par la production bactérienne dans la production de la biomasse située en amont du zooplancton. Cette part semble être parfois équivalente à celle de la production primaire phytoplanctonique dans les lacs de niveau trophique élevé à l'exemple de ce qui est observé dans le lac du Bourget ;
- la médiane de la production bactérienne, plus grande dans les lacs les plus riches en nutriments ;
- l'amplitude des variations de la production primaire, également plus grande dans les lacs les plus riches en nutriments ;
- les nutriments organiques sont en excès vis-à-vis de la biomasse bactérienne dans les lacs de niveau trophique élevé ;
- la circulation des flux de carbone passe essentiellement par la voie hétérotrophe par comparaison avec des lacs de niveaux trophiques inférieurs ;
- l'importance de la biomasse des protistes vis-à-vis de celle des bactéries indique que, dans le lac du Bourget, celles-ci constitueraient plutôt un lien vers les niveaux trophiques supérieurs.

Comme nous allons le voir ci-dessous, les résultats que j'ai pu acquérir depuis 2002 permettent de corroborer ou de critiquer ceux obtenus par Sylvie Viboud, Xavier Gayte et Dominique Fontvieille. En effet, dans les paragraphes précédents, je me suis contenté de restituer sans autre commentaire les travaux de ces auteurs en dépit d'affirmations, de résultats ou de raccourcis pouvant paraître surprenants.

II. Résultats et premières conclusions de mes travaux concernant la boucle microbienne du lac du Bourget et de lacs voisins

Mon travail concerne l'écologie microbienne aquatique. Depuis mon arrivée à la station, cette thématique de recherche a considérablement évolué avec la prise en compte de compartiments biologiques ignorés jusque là ou du moins ne faisant pas le lieu des travaux de l'équipe anciennement nommés et pour cause *Dynamique et Evolution des Communautés Phytoplanctoniques (DECOP)* : les virus, les bactéries auto- et hétérotrophes et le petit phytoplancton pélagique. Mon travail concerne les 3 thématiques suivantes:

- la dynamique et la diversité des communautés microbiennes ;
- l'impact des virus et des protozoaires sur les communautés bactériennes ;
- l'écologie des efflorescences phytoplanctoniques (notamment les cyanobactéries).

Ces travaux de recherche se situent donc à l'interface entre écologie des communautés et écologie des écosystèmes, l'objectif général étant d'identifier les liens existants entre l'organisation (composition, structure, diversité) des communautés planctoniques et le fonctionnement des écosystèmes lacustres. La démarche mise en place au cours de ces quelques années de recherche s'est toujours appuyée à la fois sur des approches expérimentales (microcosmes *in situ*) et sur des approches "écosystèmiques" (suivis saisonniers de lacs) qui ont été souvent menées en parallèle. Les études réalisées au sein d'EMA (*Equipe de Microbiologie Aquatique*), en étroite collaboration avec Isabelle DOMAIZON de l'Université de Savoie, ont permis de commencer à combler la rareté voire l'absence de données relatives à la boucle microbienne dans les lacs péri-alpins et de faire émerger de nouveaux projets de recherche centrés sur les processus microbiens impliquant virus, bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries, protozoaires flagellés et ciliés.

Dans les paragraphes ci-dessous, j'essayerais de montrer ce que j'ai apporté à l'équipe/station en terme de thématiques de recherche sur l'écologie microbienne. Comme je l'ai esquissé plus haut, avant mon arrivée, les thématiques (écologie et écotoxicologie) de recherche étaient essentiellement centrées sur les cyanobactéries et le phytoplancton. Je ne dis pas pour autant que le compartiment bactérien était inconnu puisque Dominique FONTVIEILLE travaillait sur le bactérioplancton bien avant mon recrutement. Toutefois, mon arrivée et ces 4 dernières années ont coïncidé (voire engendré) avec :

- la mise en place de la thèse d'Ursula DORIGO encadrée par Jean-François HUMBERT et Dominique FONTVIEILLE et portant sur la diversité des bactéries hétérotrophes dans les 3 grands lacs péri-alpins (Annecy, Bourget, Léman);

- le renforcement de l'équipe avec l'intégration dans notre groupe de Dominique FONVIEILLE et surtout Isabelle DOMAIZON de l'Université de Savoie, spécialiste des protistes ;
- l'achat d'un certain nombre d'appareils pour travailler sur la dynamique (cytométre en flux) et la diversité (DGGE, extracteur d'ADN, et PFGE en cours d'acquisition) des communautés bactériennes et virales ;
- le changement de nom de l'équipe (DECOP à EMA) ;
- la mise en place de thématiques de recherche portant sur la dynamique et la diversité du picoplancton et des virus bactériophages (projets soutenus par l'INRA notamment);
- la création d'un réseau national portant sur l'écologie des virus en milieu aquatique ;
- l'organisation d'un colloque européen intitulé : *The 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology* (voir chapitre IV) ;
- une augmentation considérable des travaux sur le lac du Bourget ayant permis de réaliser une analyse plus fine de la dynamique et de la diversité des microorganismes et surtout des interactions entre les communautés microbiennes afin de définir des groupes fonctionnels pertinents et de progresser dans l'identification des voies de transfert.

II.1. La dynamique et la diversité des communautés microbiennes

II.1.1. La dynamique des populations/communautés

Tout ce qui suit dans ce chapitre a été réalisé sous mon impulsion et à ma demande mais il serait inopportun d'employer le « je » sachant qu'une bonne partie du travail a été réalisé avec le concours de mes étudiants ou d'Ursula DORIGO. Je préfère donc l'emploi du « nous » qui est beaucoup plus honnête et qui *rend à César ce qui est à César*.

Préciser les relations entre la biodiversité, la dynamique et le fonctionnement des écosystèmes peut se décliner pour différentes fonctions (production, transferts de matière et d'énergie, résistance et résilience aux perturbations), à différentes échelles spatiales (micro, méso à macro) et à différents pas de temps (avec la difficulté d'articuler le temps bref du fonctionnement et le temps long de la dynamique). L'étude de ces relations se fait en s'interrogeant sur la manière dont le fonctionnement des organismes et de leurs interactions déterminent les assemblages d'espèces, en étudiant le rôle de leur richesse et de la diversité spécifique dans le fonctionnement des écosystèmes. Les communautés microbiennes lacustres sont un excellent modèle d'étude des relations entre diversité et activité, de par aujourd'hui la facilité d'appréhender ces microorganismes et certains de leurs rôles. Avant d'apprécier diversité et activité, il est important d'obtenir des données concernant la dynamique des communautés, à commencer par des dénombrements précis.

Un énorme travail méthodologique portant sur l'utilisation et l'optimisation de la cytométrie en flux a donc été réalisé en parallèle avec la microscopie plus classique, pour le dénombrement des communautés bactériennes et virales de la colonne d'eau et des sédiments lacustres.

Pour les communautés pélagiques, nous avons préparé un certain nombre d'échantillons issus des 3 lacs (Annecy, Bourget et Léman) pris à différentes périodes de l'année et à différentes profondeurs pour optimiser le comptage des bactéries et des virus et leur préservation au moyen de différents fixateurs (formaldéhyde, paraformaldéhyde, glutaraldéhyde) par marquage des acides nucléiques au moyen de 3 colorants de la famille des SYBR (SYBR Green I, II et Gold). Différents milieux de dilution des échantillons ont aussi été testés (TAE, TBE, TE, PBS, eau du lac filtré, FACSFlow). Enfin, différentes méthodes de conservation des échantillons ont été testées (4° et -20°C pendant 1 à plusieurs jours). A chaque fois que cela était possible, nous avons comparé les résultats des comptages données par la cytométrie en flux et la microscopie à épifluorescence. Parmi les résultats en cytométrie en flux, nous avons montré qu'il est préférable, pour le comptage des bactéries, de fixer les échantillons en utilisant le glutaraldéhyde à une concentration finale de 2% et d'utiliser comme tampon du TE (Tris HCl EDTA) récent non autoclavé à pH 7,5 et filtré à travers 0,02 µm au moyen d'un filtre seringue. Les meilleurs résultats ont aussi été obtenus en marquant les bactéries pendant 15 minutes à l'obscurité avec du SYBR Green I à une concentration finale de 10^{-4} de la solution mère. Pour les virus, nos résultats ont montré qu'il n'était pas nécessaire de fixer les échantillons et que les meilleurs rendements étaient obtenus avec du TE filtré et le colorant SYBR Gold utilisé à une concentration de $2x10^{-5}$, après avoir chauffé les échantillons marqués à 75°C pendant 10 minutes (**Figure 6**). Les échantillons pouvaient être conservés à 4°C pendant 24 heures sans que les abondances de bactéries ne changent significativement mais ce n'était pas le cas pour les virus. Les conditions requises pour compter les bactéries et les virus en microscopie à épifluorescence étaient différentes de celles obtenues avec la cytométrie. Les filtres étaient colorés avec du SYBR Gold à une concentration de 10^{-3} de la solution mère. Les lames pouvaient être conservées pendant 1 mois si elles étaient rapidement congelées à -20°C sans perte importante des particules. L'ensemble de ces résultats a clairement révélé combien il est important de définir le meilleur protocole au sein de son laboratoire en fonction des écosystèmes étudiés, de l'appareillage et des méthodes utilisés.

Dorigo, U., S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Routine quantification of freshwater microbial communities using flow cytometry and epifluorescence microscopy: case studies in French alpine lakes. *Syst. Appl. Microb. (en révision)*

Jacquet, S., Personnic, S., S. Duhamel and T. Sime-Ngando. **2004** Flow cytometry and methods to assess viral-induced mortality of bacterioplankton. Communication orale au 1st Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, October 2004.

L'existence de nombreux colorants et la mise sur le marché de nouveaux fluorochromes m'engagent à penser que d'autres tests seront à prévoir dans les prochaines années afin d'optimiser encore et toujours la ou les procédures de comptage des communautés/populations microbiennes. La conservation des échantillons dans l'azote liquide sera testée prochainement car elle semble favoriser le marquage et la détection des particules virales.

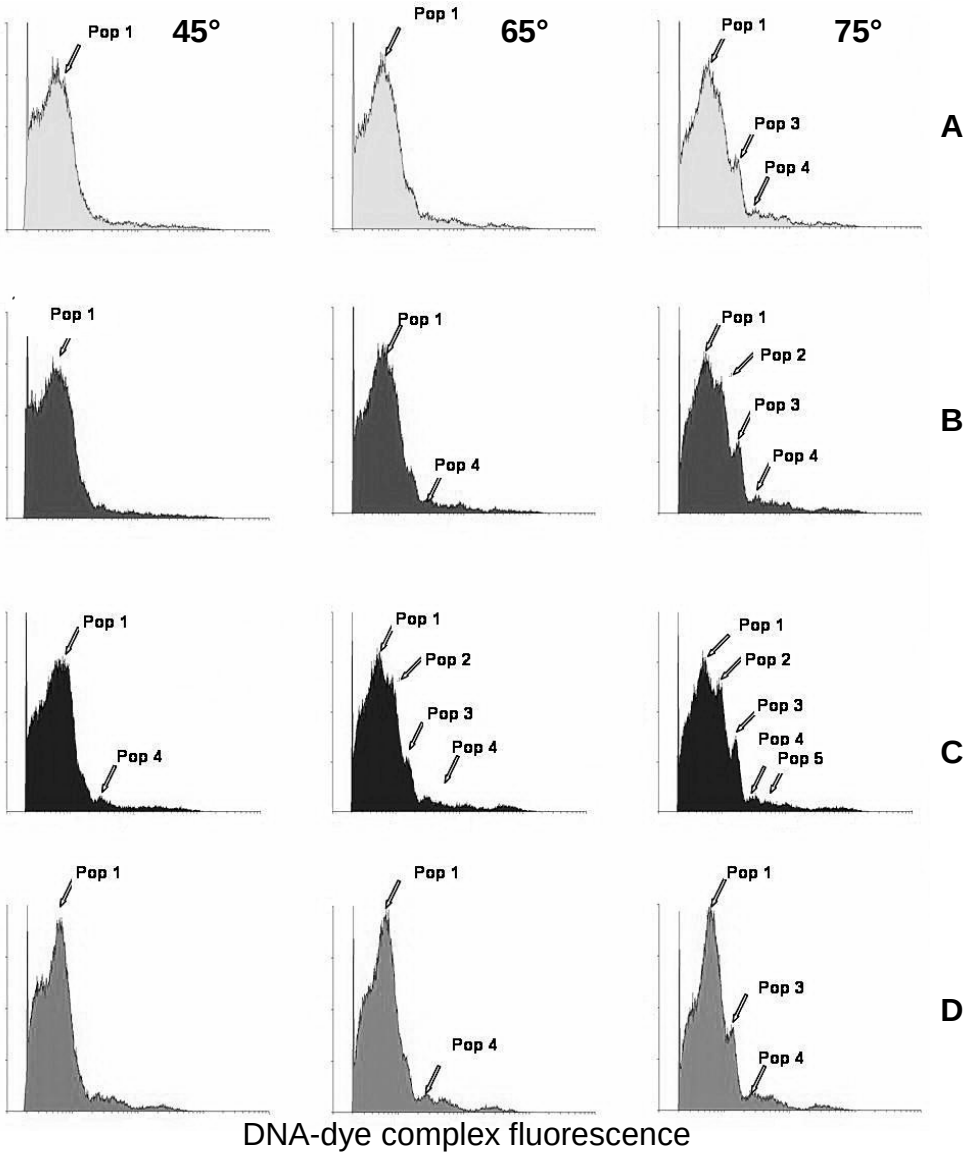


Figure 6 : Histogrammes des distributions virales obtenues par cytométrie en flux permettant de révéler l'existence de différents groupes. Les échantillons ont été marqués avec le colorant SYBR Gold aux concentrations finales 10^{-4} (A), 5 x 10^{-5} (B) ou 2 x 10^{-5} (C) ou avec du SYBR Green I à la concentration finale de 10^{-4} (D). Les échantillons ont été incubés à différentes températures (45°C, 65°C ou 75°C) pendant 10 minutes. Figure extraite de Dorigo et al. (en révision).

La cytométrie en flux a aussi été utilisée avec succès pour dénombrer les bactéries et les virus originaires des sédiments lacustres (Bourget et Léman) après un traitement relativement simple des échantillons et optimisation des procédés de dilution/fixation/marquage. Jusqu'à ce travail, le dénombrement à la fois des virus et des bactéries dans les sédiments aquatiques n'avait jamais été réalisé au moyen de la cytométrie en flux. Nous avons donc voulu voir s'il était possible de proposer une méthode alternative à la microscopie à épifluorescence et à la microscopie électronique à transmission. De plus, l'écologie microbienne dans les milieux sédimentaires a été très peu mise en avant. Des informations aussi basiques que les dynamiques spatiale et temporelle sont quasiment inexistantes à ce jour. Pourtant, les sédiments peuvent jouer un rôle clef dans le cycle du carbone et il se pourrait qu'une large fraction de la dégradation du carbone soit réalisée par des processus d'origine benthique (Danovaro et al. 2002; Middelboe et al. 2004). Enfin, on sait que les sédiments constituent potentiellement un réservoir énorme en bactéries et virus (Middelboe 2005). Pour résumer notre travail, les particules biologiques ont été séparées en utilisant du Sodium Pyrophosphate (0.01 M) et du Polyoxyethylene-Sorbitan Monooleate (10%), le tout étant soniqué pendant 3 minutes dans un bain d'eau sans glace. Les comptages les plus élevés ont été obtenus en fixant les échantillons avec du formaldéhyde à une concentration finale de 2% puis un marquage avec du SYBR Green 2 à une concentration finale de 10^{-4} de la solution mère. On voit donc là une première différence quant à l'efficacité du colorant par rapport aux particules présentes dans la colonne d'eau. Il y avait une perte importante de particules après seulement quelques jours de conservation à 4°C. L'utilisation de DNAse à 1% final a clairement révélé l'importante quantité d'ADN libre se traduisant par une sur-estimation jusqu'à 17% du compartiment viral sans traitement avec la DNAse. Pour la cytométrie en flux, les échantillons étaient dilués dans du TE et chauffés à 75°C pendant 10 minutes. Une bonne corrélation était obtenue entre la cytométrie en flux et la microscopie à épifluorescence bien que les concentrations étaient toujours les plus élevées avec la première technique (**Figure 7**). L'analyse de la distribution des virus et des bactéries dans la colonne d'eau et dans les sédiments du lac du Bourget a clairement montré un gradient marqué avec des concentrations très élevées dans les premiers centimètres des sédiments, jusqu'à 200 fois plus élevées pour les virus et jusqu'à 2200 fois plus élevées pour les bactéries que celles trouvées en milieu pélagique. Toutefois, les rapports entre virus et bactéries étaient faibles dans le sédiment comparativement à la colonne d'eau, suggérant une faible relation entre ces compartiments dans le sédiment. Ce résultat a été confirmé par la microscopie électronique a transmission avec la détection d'une très faible proportion de bactéries infectées et essentiellement localisé dans le premier centimètre, en juin 2004. Il n'est pas question pour le moment de donner des suites à ce travail essentiellement méthodologique.

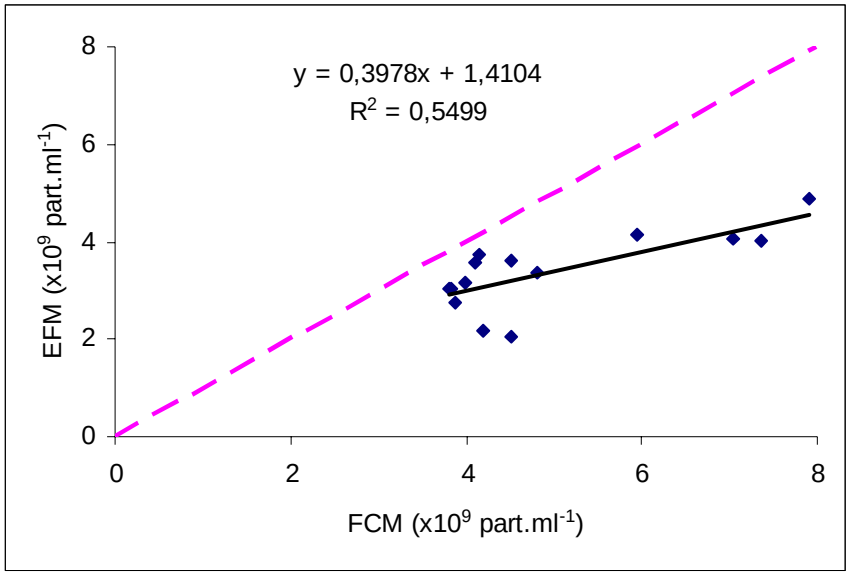


Figure 7: Comparaison des abondances virales obtenues après optimisation des protocoles définis pour la cytométrrie en flux (FCM) et la microscopie à épifluorescence (EFM). Figure extraite de Duhamel & Jacquet (en révision).

Duhamel, S. and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analysis of bacteria and virus-like particles in lake sediments. *J. Microbiol. Methods (en révision)*

Jacquet, S. & S. Duhamel. 2004. Using flow cytometry to detect virus-like particles in lake sediments. Communication orale au 1st Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, October 2004

Jacquet, S. & S. Duhamel. 2005. Flow cytometric analyses of bacteria and virus-like particles in lake sediments. Poster au 4th Algal Virus Workshop, Amsterdam, The Netherlands, April 2005

Cette problématique de recherche portant sur la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes des sédiments n'est pas une priorité et je ne pense pas que nous allions plus avant dans les prochains mois. Néanmoins, il est important de préciser que de nombreuses équipes travaillent au niveau international sur cette question et qu'elles seront sûrement intéressées par les résultats de nos travaux.

La dynamique des communautés virales, bactériennes, et du petit phytoplancton est suivie depuis la fin de l'été 2002 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre 0 et 50 m à raison de 2 prélèvements mensuels (**Figure 8**). Ces données viennent s'ajouter aux dénombrements classiques du micro- et macrophytoplancton pour les 3 lacs (Druart et ses co-auteurs). Nous avons donc à notre disposition un jeu de données remarquable que nous avons commencé à analyser. Depuis 2004, nous avons complété, pour les lacs Léman et du Bourget, les compartiments précités par ceux des flagellés hétérotrophes et mixotrophes et des ciliés pour obtenir une vision affinée de la structure et du fonctionnement de la boucle microbienne. Ces derniers compartiments sont comptés par microscopie à épifluorescence. Un suivi de la production bactérienne et de l'activité

enzymatique de la communauté bactérienne pour le lac du Bourget est réalisé depuis janvier 2004 dans le cadre de la thèse d'Ursula DORIGO (voir plus bas). Enfin, un certain nombre de paramètres limnologiques est disponible pour les 3 lacs (chlorophylle *a*, transparence, température, sels nutritifs, etc).

Parmi les résultats, on peut évoquer le fait que la cytométrie en flux nous a permis de séparer 3 groupes viraux d'intérêts, probablement à relier aux bacteriophages, aux cyanophages et à des virus d'espèces eucaryotiques. Pour les bactéries, il est parfois possible de discriminer différents groupes mais c'est clairement pour le phytoplancton que cette technique permet d'accéder à de nombreuses populations sur des critères de taille, de volume et de fluorescence pigmentaire.

Si l'on se concentre uniquement sur l'année 2003 afin de détailler un peu la dynamique, la communauté phytoplanctonique détectée par cytométrie en flux a une concentration moyenne annuelle de $3,80x10^3$ cellules par ml pour le lac du Bourget, de $3,30x10^3$ cellules par ml pour le lac Léman et de $1,78x10^3$ cellules par ml pour le lac d'Annecy. La communauté du lac Léman présente 3 pics de concentrations, deux fin avril et début mai entre 0 et 45 m (la colonne d'eau n'étant pas encore stratifiée) et un de 0 à 15 m de début août à mi septembre pendant la phase de stratification. La communauté du lac du Bourget présente 3 pics de concentrations, le premier durant tout le mois d'avril entre 0 et 40 mètres, le second début juillet entre 0 et 10 mètres et le dernier de début août à fin septembre entre 0 et 15 mètres. Pour le lac d'Annecy, la communauté est moins abondante que dans les 2 autres lacs. La concentration maximale étant obtenue de fin avril à début septembre.

Les picocyanobactéries (essentiellement représentées par le genre *Synechococcus* riche en phycoérythrine) ont une concentration moyenne annuelle de $2,51x10^4$ cellules par ml pour le lac du Bourget, de $3,37x10^4$ cellules par ml pour le lac Léman et de $3,10x10^4$ cellules par ml pour le lac d'Annecy. Les picocyanobactéries présentent un seul pic de concentration pour les trois lacs. Dans le lac Léman, il débute en juillet et se termine mi septembre. Contrairement à cette durée de 2 mois et demi, les picocyanobactéries du Bourget ont une concentration maximale durant 4 mois et demi de début juillet à mi octobre. Dans le lac d'Annecy, l'augmentation de la biomasse picocyanobactérienne se manifeste beaucoup plus tôt que dans les 2 autres lacs. Elle débute mi juin et se termine au début du mois de septembre.

Les bactéries hétérotrophes ont une concentration moyenne annuelle de $2,64x10^6$ cellules par ml pour le lac du Bourget, de $2,63x10^6$ cellules par ml pour le lac Léman et de $2,17x10^6$ cellules par ml pour le lac d'Annecy. Les bactéries des lacs mésoeutrophes (Léman et Bourget) connaissent 3 pics de concentrations durant l'année alors que le lac oligotrophe (Annecy) n'en connaît qu'un. Il y a un léger décalage temporel entre le lac Léman (le plus précoce) et le lac du bourget. Le premier pic de concentration bactérienne du Léman est observé fin avril entre 0 et 30 m, les deux autres en juillet et début septembre entre 0 et 15 mètres. Les 3 pics de concentrations

bactériens du Bourget ont pour date : début mai, août et octobre entre 0 et 15 mètres. L'augmentation de la biomasse bactérienne du lac d'Annecy a lieu de mi juillet à fin octobre entre 10 et 25 mètres.

Les virus ont une concentration moyenne annuelle de $6,77x10^7$ particules par ml pour le lac du Bourget, de $5,54\ x10^7$ particules par ml pour le lac Léman et de $5x28x10^7$ particules par ml pour le lac d'Annecy. Les virus, comme cela a été décrit peuvent être divisés en 3 groupes distincts. Les VLP1 (*Virus-like particle group 1*) ont un réel pic de concentration une seul fois dans l'année pour les trois lacs. Il a lieu début septembre dans le lac Léman, et de fin août à début septembre pour les 2 autres lacs. Les concentrations moyennes annuelles sont de $6,31x10^7$ particules par ml pour le lac du Bourget, de $5,17x10^7$ particules par ml pour le lac Léman et de $4,93x10^7$ particules par ml pour le lac d'Annecy. Ces virus constituent l'essentiel de la communauté virale et sont en moyenne pour les trois lacs 18 fois plus nombreux que les VLP2 et 120 fois plus nombreux que les VLP3. Le VBR (nombre de VLP1 sur le nombre de bactéries) moyen par lac est de 24, 23 et 20 pour le lac du Bourget, d'Annecy et du Léman. Les VLP2, comme les VLP1, ont un réel pic de concentration une seul fois dans l'année pour les trois lacs. Il a lieu entre 0 et 20 mètre pour le lac Léman et du Bourget, et au delà pour le lac d'Annecy. Les pics de VLP2 ont une durée beaucoup plus importante que les VLP1. Il a lieu de début juillet à mi septembre dans le lac Léman, avec une concentration moyenne annuelle de $2,85x10^6$ particules par ml. Pour le lac du Bourget, avec une concentration annuelle de $3,68x10^6$ particules par ml, le pic de VLP2 dure de mi juillet à la fin du mois d'octobre. Pour le lac d'Annecy, la concentration annuelle est de $2,93x10^6$ particules par ml, et le pic de VLP2 dure du mois de septembre jusqu'à la fin du mois d'octobre. Les VLP2 sont en moyenne 7 fois plus nombreux que les VLP3. Le VCR (nombre de VLP2 sur le nombre de pico cyanobactéries) moyen par lac est de 145, 95 et 85 pour le lac du Bourget, d'Annecy et du Léman. Dans les 3 lacs les VLP3, contrairement aux VLP1 et VLP2, présentent dans l'année 2 pics de concentrations, le premier au printemps et le second en été. Les concentrations moyennes annuelles sont de $5,04x10^5$ particules par ml pour le lac du Bourget, de $5,08x10^5$ particules par ml pour le lac Léman et de $3,87x10^5$ particules par ml pour le lac d'Annecy.

Les protozoaires sont essentiellement composés dans les trois lacs alpins des ciliés et flagellés. Il n'existe pour le moment aucun suivi régulier des protistes hétérotrophes dans le lac d'Annecy (le dernier en date a été fait entre avril et septembre 2001, Domaizon et al. 2003). Les flagellés hétérotrophes ont une concentration moyenne annuelle de 249 cellules par ml dans le lac Léman et de 646 cellules par ml dans le lac du Bourget. Les flagellés mixotrophes, ont été comptabilisés avec les flagellés autotrophes. Les flagellés hétérotrophes du Léman présentent un seul pic de juillet à août alors que ceux du Bourget ont 2 pics, le premier de mai à juin et le deuxième fin août. Les ciliés hétérotrophes ont une concentration moyenne, du mois de janvier au

mois de juillet, de 12 cellules par ml dans le lac Léman et de 15 cellules par ml dans le lac du Bourget. Les 2 pics de concentrations des ciliés du Léman ont pour date : avril et août septembre. Le pic cilié du lac du Bourget a lieu de fin à juin à début juillet.

Le suivi comparatif des communautés et l'analyse multivariée des données (en cours au moment du dépôt de ce dossier) permet d'élaborer les tendances relationnelles existant entre les différents groupes :

- Les bactériophages (VLP1) et les flagellés hétérotrophes semblent avoir un rôle majeur dans la mortalité bactérienne en été, alors que ce contrôle semble plus minime au printemps ;
- Durant leur unique pic estival, les picocyanobactéries semblent être constamment soumises aux pressions exercées par les cyanophages (VLP2) et les flagellés hétérotrophes ;
- L'influence des virus VLP3 sur les pico-nano eucaryotes hétérotrophes est plus complexe à déterminer. Cependant l'étude de la dynamique de ce groupe VLP3 a permis de confirmer, grâce au pic printanier, qu'il s'agissait bien de virus utilisant comme cellules hôtes des eucaryotes autotrophes. Nous sommes donc en présence d'un groupe viral ayant un fort impact de lyse sur la communauté pico-nano phytoplanctonique mais également sur le microphytoplancton.

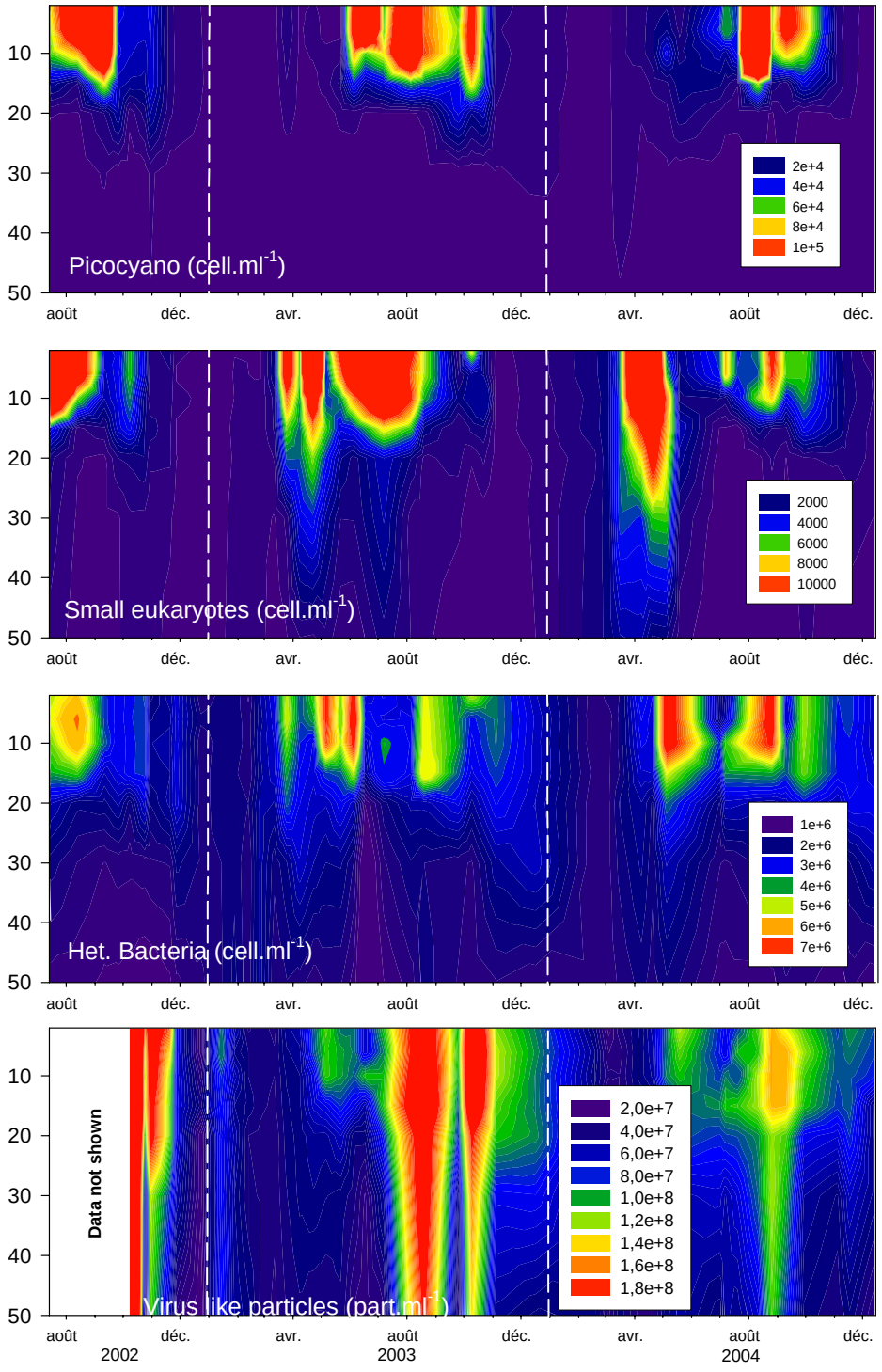
L'exploitation détaillée de l'ensemble de ces résultats et leur valorisation est en cours :

Personnic, S., U. Dorigo, B. Leberre and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analyses of microbial communities (viruses, bacteria and small phytoplancton) on Lakes Annecy, Bourget and Geneva, France. *Aquatic Microbial Ecology (en préparation)*

Personnic, S., I. Domaizon, A. Millery and **S. Jacquet**. **2005**. Dynamics and interactions within the microbial communities of lake Geneva with a dominant viral axis. Poster au 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology. Thonon, France, February 2005.

Personnic, S., I. Domaizon, **S. Jacquet**. **2005**. Dynamique des communautés microbiennes des lacs périalpins : impact des virus. Communication orale au 2nd Colloque d'Ecologie Microbienne, Obernai, France, mai 2005.

Une critique majeure aux résultats précédemment exposés est le caractère très général donné par la cytométrie en flux. En effet, si cette technique est extraordinaire de fiabilité et de rapidité, elle ne permet que de s'intéresser aux communautés sur des critères de fluorescence et relatifs à la taille et il est difficile voire rare de pouvoir descendre au niveau populationnel. Pourtant, il ne fait aucun doute que la diversité au sein des communautés virales, bactérienne, picocyanobactérienne et des petits eucaryotes est élevée et que nous n'avons là qu'une information partielle sur la dynamique des populations. Nous avons commencé avec le MASTER de Maria CELLAMARE d'examiner la diversité des petits eucaryotes sur les 3 lacs (voir plus loin). Nous avons entamé de regarder par séquençage de bandes DGGE sur produits amplifiés par PCR la diversité picocyanobactérienne et eucaryotique au cours d'expériences effectuées sur le lac du Bourget. L'exploitation des résultats est en cours et elle permet de conclure sur l'évidence suivante : c'est l'utilisation de toutes ces techniques et du lien entre elles qui présente un véritable intérêt et l'avenir pour une meilleure compréhension de ce qu'est la diversité structurelle et fonctionnelle des communautés caractéristiques de la boucle microbienne lacustre.



La figure 8 ci-dessous extraite de Personnic et al. (en préparation) révèle l'évolution des concentrations en ml entre 0 et 50 m des communautés de picocyanobactéries, des petites eucaryotes, des bactéries hétérotrophes et des virus de juillet 2002 à décembre 2004.

II.1.2. La diversité des populations/communautés

II.1.2.1. Les virus

Alors que les virus sont les entités biologiques les plus abondantes dans les écosystèmes aquatiques, leur diversité ainsi que leur rôle fonctionnel dans le contrôle (mortalité) des proliférations de microorganismes en milieu lacustre sont à ce jour encore largement méconnues. Comme je l'ai spécifié plus haut, la cytométrie en flux a déjà permis de discriminer 3 à 4 groupes viraux sur des critères de taille et de fluorescence du complexe ADN-marqueur et des liens peuvent être faits entre certaines communautés. Nous sommes allés bien au-delà en nous intéressant à la diversité des cyanophages (virus de cyanobactéries) dans le lac du Bourget en utilisant des approches de biologie moléculaire. Notre approche par séquençage et utilisation de la Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) sur un gène (*g20*) codant pour une protéine de la capside virale a permis de montrer pour la première fois, que la communauté des cyanophages était très diversifiée dans le lac du Bourget (**Figure 9**). Cette diversité est du même ordre que celle observée pour cette même communauté à partir de prélèvements réalisés dans différentes mers du globe. Les 66 séquences obtenues se regroupent après analyse phylogénétique, en 6 clusters distincts. Certains de ces clusters montrent une proximité plus forte avec des séquences obtenues en milieu marin qu'avec les autres clusters d'eau douce. Une saisonnalité évidente a été observée par séquençage et utilisation de la DGGE dans l'abondance relative de ces différents clusters et dans l'abondance absolue de cette communauté. L'analyse comparée de ces variations et de celle de leurs hôtes potentiels (picocyanobactéries et cyanobactéries filamenteuses) suggéraient que ces virus sont essentiellement des parasites de picocyanobactéries (probablement du genre dominant *Synechococcus* spp.). Aucun lien évident ne semblait en revanche exister entre la dynamique de *Planktothrix rubescens*, qui est une cyanobactérie filamenteuse toxique posant de gros problèmes dans le lac du Bourget, et la dynamique de cette communauté virale. Ce résultat, ajouté à d'autres (l'étude de la dynamique des communautés virales et de P. rubescens, les essais d'isolement sans résultat) laisse penser qu'un contrôle efficace des proliférations de *P. rubescens* par le parasitisme viral est peu probable. Le développement d'amorces spécifiques à chacune des unités taxonomiques identifiées et leur utilisation en PCR quantitative pourrait nous permettre d'effectuer une quantification des cyanophages beaucoup plus précise et plus rapide des variations saisonnières de leur dynamique. Ces variations pourraient être reliées aux variations des communautés d'hôtes potentiels afin de mieux apprécier l'impact des communautés virales sur ces populations hôtes. Ce travail sera, je l'espère, celui d'un post-doc étranger en cours de recrutement et qui pourra utiliser la technique de PCR en temps réel, récemment acquis par l'équipe EMA. Un autre matériel est en cours d'acquisition, l'électrophorèse en champ pulsé (Pulse Field Gel Electrophoresis) qui permettra de s'intéresser à la diversité virale globale.

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2004**. Cyanophage diversity, inferred from g20 sequence analyses, in the largest French lake in France, Lake Bourget. *Appl. Environ. Microbiol. 70:1017-1022*

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2005**. Cyanophage diversity in Lake Bourget. Communication orale au 1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology. Thonon, France, February 2005.

Dorigo, U., **S. Jacquet** et J.-F. Humbert. **2003**. Diversité génétique des cyanophages dans le lac du Bourget. Communication orale au GRISCYA, Paris, France, novembre 2003.

Dorigo, U., **S. Jacquet** et J.-F. Humbert. **2003**. Diversité génétique des cyanophages dans le lac du Bourget. Communication orale à la CILEF, Montréal, Canada, Juillet 2003.

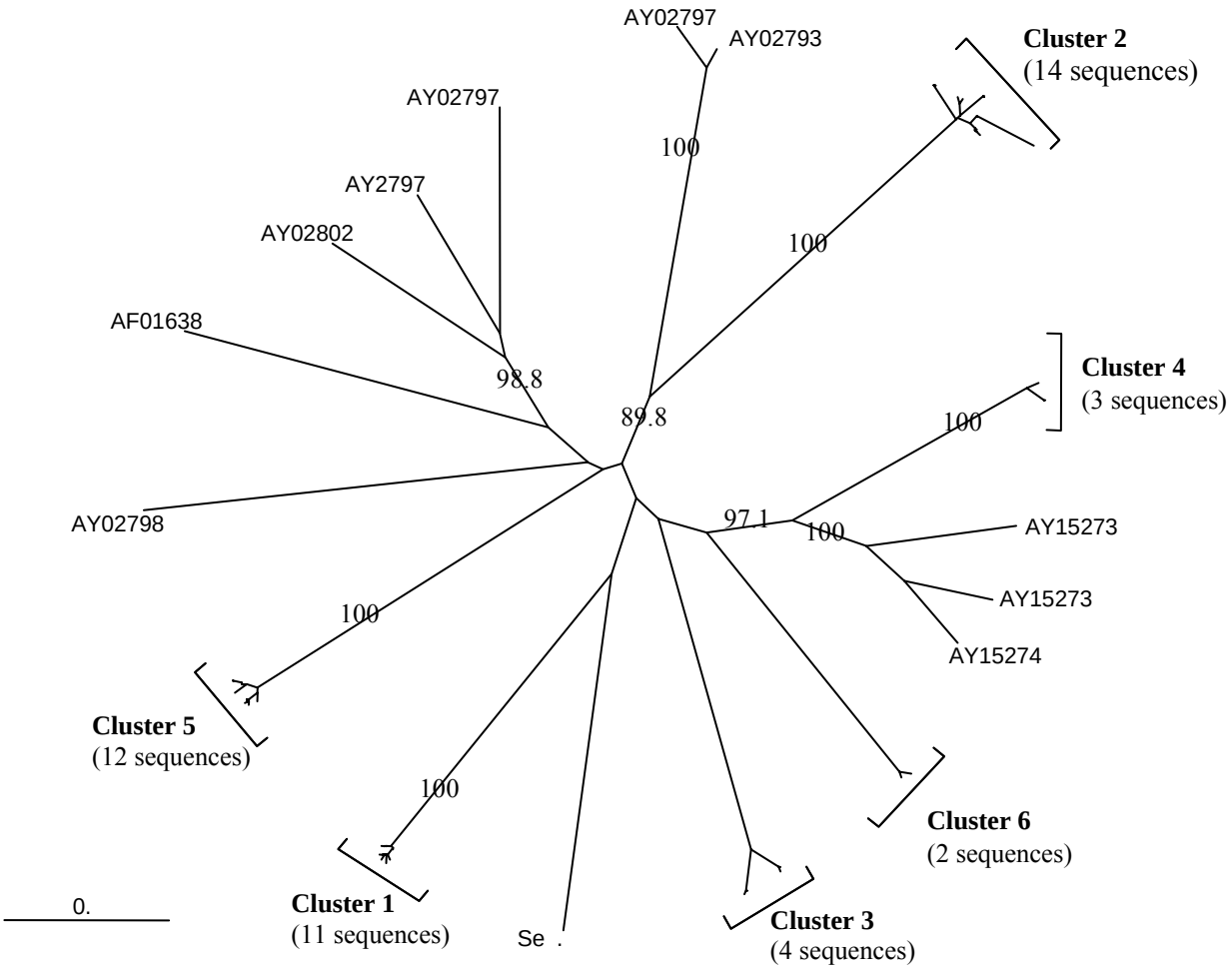


Figure 9 : Relations phylogénétiques entre les séquences partielles du gène g20 de la communauté des cyanophages du lac du Bourget. Cet arbre a été construit à partir des distances par paire de Jukes & Cantor en utilisant la méthode des plus proches voisins. Les séquences des cyanophages marins, identifiés dans *Genebank* ont aussi été ajoutées. Figure extraite de Dorigo et al. (2004).

Faisant suite à ce travail portant sur la diversité des cyanomyovirus du lac du Bourget, j'ai tenté d'isoler un ou plusieurs virus infectant les picocyanobactéries riches en phycoérythrine des lacs d'Annecy et du Bourget, ce qui n'avait jamais été fait auparavant pour le milieu lacustre. Dans un premier temps, un gros effort a été consenti pour trier des populations picocyanobactériennes par cytométrie en flux, puis pour les faire pousser en milieu liquide puis solide puis de nouveau liquide pour obtenir des souches les plus pures possible. Ce travail a été

effectué par Madame MENTHON, technicienne de notre équipe, et spécialiste des cultures de microalgues. A partir de deux souches picocyanobactériennes isolées du lac d'Annecy et après avoir répété des expériences d'infection avec des échantillons naturels concentrées et enrichis uniquement en particules virales, un virus a pu être isolé sur la base de sa signature cytométrique (**Figure 10**). Pour le caractériser, sa susceptibilité à infecter différentes souches de picocyanobactéries et de microalgues a été testée révélant une grande spécificité puisque seules les souches isolées de nos lacs étaient infectées. De manière très intéressante, la vitesse d'infection était différente suivant les deux souches cyanobactérienne, pourtant très proche génétiquement (à plus de 95%). La charge virale était calculée à environ 150 virus par cellule. Les analyses d'échantillons en microscopie électronique et des séquences de protéines de 4 clones ont révélé une grande homologie de ressemblance avec la famille des bactériophages de type T4, c'est-à-dire appartenant à la famille des cyanophages la plus souvent rencontrée en milieu aquatique, les Myoviridae (**Figure 10**). Néanmoins, les analyses en DGGE sur le gène codant pour la protéine de capside *g*20 n'ont jamais permis d'identifier ce virus comme appartenant au groupe des Myoviridés. Il est clair que nous allons pouvoir réaliser à l'avenir, grâce à ces différents isolats purifiés (virus et cyanobactéries), un grand nombre d'expériences au laboratoire, avec pour objectif ultime de mieux comprendre le rôle écologique de ce type de virus. *In fine*, les résultats de ces travaux nous donneront une meilleure idée du rôle de ces cyanophages dans le contrôle de la dynamique et de la diversité des picocyanobcatéries, le compartiment biologique autotrophe clef de la boucle microbienne.

Jacquet, S., T. Sime-Ngando, U. Dorigo, A. Millard, B. Leberre, J. Lepault and B. Delmas. **2005**. A new dsDNA virus infecting PE-rich freshwater picocyanobacteria. *En préparation*

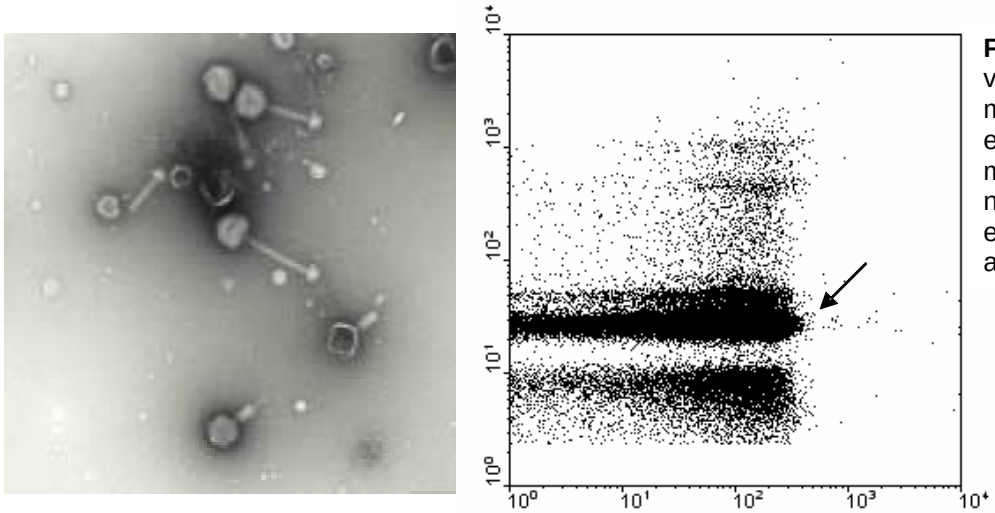


Figure 10: Images du virus SynVir obtenu en microscopie électronique et en cytométrie après marquage des acides nucléiques. Figures extraites de Jacquet et al. (en préparation).

Au mois d'avril 2005, j'ai participé au 4ème Workshop sur les virus de microalgues qui s'est tenu à Amsterdam. Je crois que cet atelier de travail aura fini de me convaincre de l'importance que notre groupe aura, dans les années à venir, à fournir pour travailler sur l'écologie des virus de microalgues eucaryotiques en plus des cyanophages. Il n'est plus à démontrer combien des virus peuvent avoir un rôle important dans la structure et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques, dans le contrôle et la terminaison des efflorescences, etc. En France, aucune équipe ne s'est encore intéressée à cette problématique et je commencerai en 2006 avec l'accueil d'un stage de MASTER-2 et/ou mieux le recrutement d'une chercheur post-doctoral pour entamer ce travail. Il s'agira 1) d'utiliser la PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) pour travailler sur le génome entier des virus en milieu naturel et apprécier la diversité globale et ses évolutions dans le temps et l'espace ; 2) d'utiliser la DGGE sur produits amplifiés ciblant les gènes POL, g20, AVS spécifiques à certaines populations virales cyanobactériennes et eucaryotiques ; 3) de réaliser des isolements et expériences d'infection pour apprécier le rôle de ces virus dans le contrôle de la dynamique et de la diversité phytoplanctonique.

II.1.2.2. Les bactéries

La diversité des bactéries hétérotrophes a été étudiée par Jérôme COMTE dans le cadre de son DEA sur le lac du Bourget afin de déterminer les changements dans le temps et l'espace de la diversité des principaux groupes bactériens obtenus par la méthode FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*). Durant cette étude, qui s'est déroulée de mars à juillet 2002, nous avons pu montrer que la communauté des bactéries hétérotrophes du lac du Bourget était essentiellement constituée de petites formes coccoïdes (inférieure à 2 µm en taille) mais des formes filamenteuses, communément considérées comme des formes résistantes à la pression de prédation par les nanoflagellés, étaient aussi dénombrées. Ces dernières appartenaient essentiellement au groupe des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) et étaient très abondantes pendant le printemps et au début de l'été quand les flagellés hétérotrophes et mixotrophes étaient les principaux prédateurs. Les CFB dominaient les cellules détectées par la méthode FISH alors que des changements étaient observés au début de l'été avec une augmentation de la proportion des *α*- et *β-Protéobactéries* (**Figure 11**). Les modifications de la composition des communautés bactériennes pouvaient impliquer des changements dans les processus de prise en charge de la matière organique et dans les flux de carbone transitant par la boucle microbienne. Ainsi, le fait de considérer les bactéries comme un seul groupe (population) peut en partie expliquer notre compréhension encore très sommaire des facteurs et processus contrôlant les flux d'énergie et de matière. Je mets beaucoup

d'espoir dans l'utilisation de cette technique FISH via l'utilisation de sondes oligo-nucléotidiques au sein de notre équipe pour mieux appréhender les relations structure-fonction du compartiment bactérien. Elle pourra être associée à la cytométrie en flux et l'utilisation d'une batterie de colorants donnant des informations sur la viabilité et l'activité cellulaires. C'est avec Rémy TADONLEKE, chercheur nouvellement recruté, que nous en exploreront les potentialités. Les tests sont en cours et 5 à 6 sondes devraient être utilisées dans le cadre du projet portant sur l'impact des ultra-violets sur la boucle microbienne (voir plus bas).

La diversité du bactérioplancton pélagique des lacs Léman, Bourget et Annecy a aussi été étudiée dans le cadre de la thèse d'Ursula DORIGO via l'utilisation de la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) sur une portion du gène codant pour l'ARNr 16S. La réalisation de plusieurs banques de clones et leur analyse a également été réalisée. L'échantillonnage a été effectué pour les 3 lacs à leur station de référence respective, sachant qu'une étude préliminaire sur le lac du Bourget avait révélé une très bonne homogénéité horizontale et verticale au sein d'une même couche thermique de la diversité bactérienne à l'échelle de l'ensemble du lac pour ses zones pélagiques. 4 profondeurs ont été sélectionnées (2, 15, 30 et 50 m) pendant l'année 2003. Les produits de PCR, obtenus avec des amorces spécifiques des eubactéries (358f-GC et 907rM) ont été chargés dans des gels de DGGE avec un gradient de denaturation de 40-80%. Le clonage-séquençage a aussi été fait à différentes périodes clefs de l'année (hiver, printemps, été) et à des profondeurs différentes (2 et 50 m) dans chacun des trois lacs. 30 clones par banque de clone ont été séquencés à chaque fois. A partir de l'analyse de DGGE de l'ARNr 16S, il a été trouvé : (i) en hiver une diversité très homogène au niveau horizontale et verticale ; (ii) en période stratifiée, des communautés différentes au seins de chaque couche thermique ; (iii) de nombreuses bandes (populations) communes pour les 3 lacs ; (iv) avec des différences quant à l'intensité des différentes bandes (abondance relative des populations bactériennes) ; (v) une influence saisonnière très forte sur la composition des communautés bactériennes Concernant les résultats issus du clonage-séquencage, parmi les 480 séquences retenues pour l'analyse finale, plus de 50 % d'entre elles appartenaient aux *Actinobactéries*, 16 % aux α-*protéobactéries*, 15 % aux β- *protéobactéries*, 2,8 % aux groupes des γ- *protéobactéries* et enfin 5,1 % au groupe des *Cytophaga-Flexibacter-Bactéroides*. Les proportions de chacun de ces groupes taxonomiques sont globalement très similaires d'un lac à l'autre quelles que soient la saison et la profondeur. Malgré le nombre important de clones séquencés, celui-ci s'avère nettement insuffisant pour travailler à des niveaux taxonomiques plus fins. L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'en dépit d'états trophiques très différents, les lacs alpins hébergent des communautés bactériennes pélagiques très similaires par leur composition. Ceci révèle que les variables environnementales, autres que les facteurs biotiques, jouent probablement un rôle fondamental dans la structuration de ces communautés.

Cette question de la diversité bactérienne et de ses changements dans le temps, toujours en utilisant la méthode d'empreinte moléculaire par DGGE, a aussi été appréhendée au cours d'expériences consistant à regarder l'influence de la prédation par les protistes flagellés et du parasitisme par les virus. Le détail de ces expériences réalisées sur le lac du Bourget à trois périodes différentes de l'année est explicité plus loin. Les profils DGGE ont révélé des changements notables de la diversité bactérienne en seulement 48 h et en fonction de la présence/absence des prédateurs et des virus. Nos résultats ont ainsi clairement révélé que la diversité bactérienne augmentait avec la complexité des systèmes étudiés, c'est à dire en présence à la fois des virus et des prédateurs comparativement à la présence unique des virus, sans les flagellés.

Comte, J., **S. Jacquet**, S. Viboud, D. Fontvieille, G. Paolini and I. Domaizon. **2005**. Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, Savoie, February to July 2002). *Microb. Ecol. (sous presse)*

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2003**. Dynamics and diversity of heterotrophic bacteria in Annecy, Bourget and Geneva lakes. 1st FEMS Symposium, Ljubljana, Slovenia, June 2003.

Dorigo, U., D. Fontvieille, **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2004**. Use of DGGE and cloning-sequencing techniques for the assessment of the dynamic of microbial communities in alpine lakes. Communication orale au 1st Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, October 2004

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2003**. Dynamics and diversity of heterotrophic bacteria in Annecy, Bourget and Geneva lakes. Poster au 1st FEMS Symposium, Ljubljana, Slovenia, June 2003

Dorigo, U., **S. Jacquet** et J.-F. Humbert. **2003**. Dynamique et diversité des communautés bactériennes hétérotrophes dans les 3 lacs sub-alpins : Annecy, Bourget, Léman. Poster aux Conférences INRA sur la Microbiologie, Paris, France, mai 2003

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, U. Dorigo and T. Sime-Ngnado. **2005**. Grazing influences virus-induced bacterial mortality within short-time scales. *En préparation*

Le développement de la méthode FISH ou encore de la t-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) me semble vraiment les méthodes d'avenir pour notre équipe pour s'intéresser à la diversité des grands groupes bactériens de manière routinière et pour descendre à l'espèce lors d'expériences ciblées en système expérimental ou dans le milieu naturel. Si mon projet sur les virus se réalise dans les mois/années à venir, la confrontation entre diversité bactérienne et virale sera particulièrement intéressante. Pour la méthode FISH, il est prévu de s'intéresser aux différents groupes suivants : le domaine *Bacteria* avec la sonde EUB338, les sous classes alpha, béta et gamma de la classe des *Proteobacteria* avec les sondes ALF968, BET42a etGAM42a, le groupe des *Cytophaga-Flavobacter* avec la sonde CF319a, le groupe des *Actinobacter* avec la sonde HGC69a et le domaine des *Archebacteria* avec la sonde ARCH915.

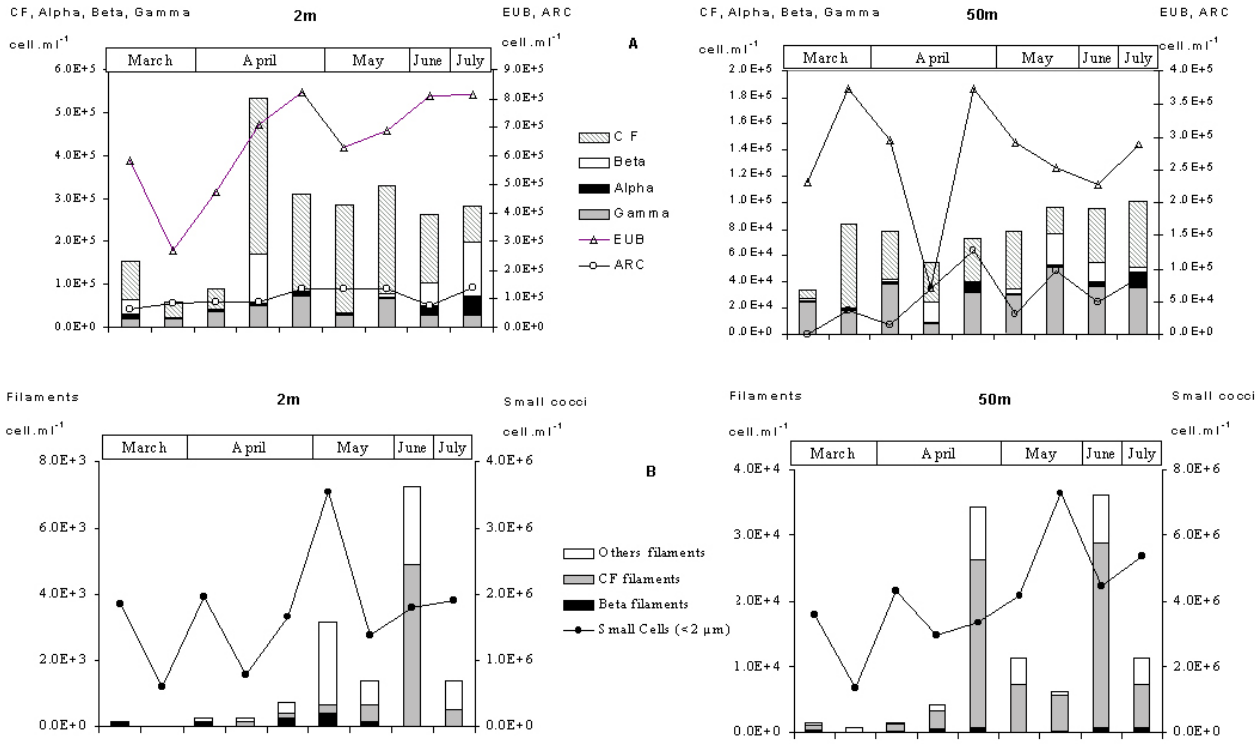


Figure 11 : Changements saisonniers de l'abondance des différents groupes bactériens détectés par méthode FISH à 2 et 50 entre mars et juillet 2002. (A, B): Alpha proteobacteria (Alpha), Beta proteobacteria (Beta), Gamma proteobacteria (Gamma) and *Cytophaga Flavobacterium* (CF); (C, D): cocci et formes filamenteuses. Figure extraite de Comte et al. (in press).

II.1.2.3. Les protozoaires

La diversité des protozoaires flagellés et ciliés a été examinée au cours de plusieurs projets portant sur la distribution spatiale et temporelle de ces microorganismes dans les lacs Léman et du Bourget mais aussi au cours d'expériences en microcosmes *in situ* portant sur l'impact de la prédation sur les communautés bactériennes. Sur le lac du Bourget, dans le cadre du DEA de Jérôme COMTE, nous nous sommes intéressés à la structure des principaux groupes flagellés et ciliés et au fonctionnement de la boucle microbienne. Ainsi, nous avons montré que les ciliés étaient largement représentés par les groupes des Oligotriches (*Strombidium, Halteria*), Prostomates (*Holophrya, Urotricha, Coleps*) et Scuticociliés (*Uronema, Cyclidium*), tandis que les nanoflagellés étaient essentiellement constitués de taxons appartenant aux Cryptomonades et Chrysomonades (*Chrysidalis, Dinobryon, Cryptomonas, Rhodomonas* pour les pigmentés ; *Katablepharis, Monas* pour les non pigmentés). Les dynamiques de *Cryptomonas sp.* et de *Dinobryon sp.* suggéraient l'importance des formes mixotrophes en tant que consommateurs des bactéries (**Figure 12**). Cela a été vérifié au travers d'expériences basées sur le principe d'ingestion de microsphères par les différentes formes flagellées présentes dans les échantillons. Une approche similaire effectuée sur le lac d'Annecy avait permis de montrer que ces taxa mixotrophes prennent une part encore plus grande dans la bactérivorie dans cet écosystème oligotrophe (Domaizon *et al.* 2003). L'étude de la

dynamique et de la diversité des protozoaires flagellés et ciliés sur le lac du Bourget a permis de mettre en évidence trois périodes distinctes dans le fonctionnement de la boucle microbienne de l'épilimnion, périodes au cours desquelles on observe des changements saisonniers dans l'importance relative des différents taxa (ciliés flagellés et métazooplancton) dans la régulation des bactéries hétérotrophes (effet du broutage) et dans la pression de prédation taxon-spécifique (voir plus bas). Ces observations, réalisées *in situ*, ont été complétées par les résultats d'une approche expérimentale basée sur le fractionnement des communautés, qui nous a permis de vérifier ces modifications saisonnières dans les voies trophiques repérées au sein de la boucle microbienne. Ces expérimentations mettent toutefois en évidence le rôle relativement constant des flagellés hétérotrophes de petite taille (< 5µm) dans la régulation des bactéries hétérotrophes. Parmi ces picoflagellés, des cellules de type *Monas* sont recensées, mais d'autres taxa (uniflagellés 2µm) demeurent non identifiés en microscopie et c'est l'utilisation de méthodes moléculaires qui devrait permettre une identification précise de ces espèces (perspective de travail).

Domaizon, I., U. Dorigo, S. Personnic, J. Comte, A. Mbade Sene, A. Millery, D. Fontvieille and **S. Jacquet**. **2004**. Assessment of protozoan predation impact on aquatic bacteria: in situ experimental approaches. Communication orale au 1st Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, October 2004

Duhamel, S., I. Domaizon, S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Assessing the microbial community dynamics and the role of viruses as bacterial mortality agents in Lake Geneva. *La Revue des Sciences de l'eau (accepté)*

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, S. Duhamel, A. S. Pradeep Ram, M. Heldal and T. Sime-Ngando. **2005**. Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Fresh. Biol. 50: 650-675*

Pour les protistes flagellés et ciliés, il existe quelques rares études ayant tenté d'utiliser la cytométrie en flux et des fluorochromes spécifiques (FISH) pour suivre des populations d'intérêt. C'est un des thèmes de recherche qui nous intéresse avec Isabelle DOMAIZON qui devrait être détaché de son enseignement universitaire en 2005-2006 et qui pourra donc s'investir pleinement dans ce projet.

II.1.2.4. Le pico- et nanophytoplancton

Nous ne savons encore quasiment rien de la dynamique et de la diversité du pico- et nanophytoplancton (formes unicellulaires et coloniales) des lacs Léman, d'Annecy et du Bourget. Dès mon arrivée à Thonon, j'ai commencé à lancer des projets de recherche simples sur ces compartiments. Avec Maria CELLAMARE (étudiante en MASTER 2 en 2005), un travail plus approfondi a commencé cette année. Depuis février 2005, nous étudions la dynamique de chacune de ces populations au moyen de la cytométrie en flux, de la microscopie à épifluorescence et

inversée. Les prélèvements sont réalisés aux stations de référence de chacun des lacs deux fois par mois et à 7-8 profondeurs entre la surface et 50 m. Pour des raisons évidentes de facilité et face à l'énorme travail que représente cette étude, la diversité n'est appréhendée que pour 3 profondeurs à 2, 10 et 15 m. Cela consiste à réaliser des isolements systématiques, grâce à la fonction de tri du cytomètre en flux, de toutes les populations discriminables sur des critères de fluorescence et de taille puis à les mettre en culture dans un mélange de 8 milieux différents utilisés et préparés en routine à la Station pour pallier à toute limitation nutritive. Les isolats sont alors mis à « pousser » dans une chambre thermostatée (18° C) et sous un cycle de lumière jour-nuit (12-12h). Régulièrement les populations sont observées en microscopie et en cytométrie en flux pour juger du degré de pureté des isolats et pour identifier chacune des espèces. Les espèces phytoplanctoniques sont alors conservées dans l'algothèque de Thonon dont je suis l'instigateur et responsable de la modernisation actuelle (Voir document joint).

Ce travail est en cours et devrait se poursuivre sous la forme d'une thèse s'il est possible de trouver un financement. Bien évidemment, le sujet de thèse irait un peu plus loin et l'étudiante pourrait s'intéresser aux questions suivantes :

- l'énumération des populations picoplanctoniques en milieu naturel (et la comparaison de leur structure entre les 3 lacs d'intérêt) selon un suivi temporel et spatial de l'abondance de ces populations en relation avec les principaux facteurs environnementaux ; les techniques employées seraient la cytométrie en flux et la microscopie à épifluorescence ;
- l'isolement par tri et la mise en culture des populations identifiables par cytométrie en flux pour identification ultérieure (caractérisation microscopique et moléculaire) ;
- l'étude de la diversité génétique afin d'appréhender les variations spatio-temporelles et successions des populations majoritaires, typiquement les picocyanobactéries (ce travail serait fait uniquement à des moments clefs de l'année) ; les techniques employées seraient la PCR, le clonage et le séquençage ;
- la détermination de la contribution du picophytoplancton à la biomasse et à la production phytoplanctonique totale (ce travail serait fait en collaboration avec un chercheur de l'équipe et seulement à une ou deux périodes clefs de l'année) ; la technique employée serait l'incorporation de radio-éléments quantifiée par compteur à scintillation ;
- des expériences de broutage et de lyse virale pour appréhender le rôle fonctionnel (relations proie-prédateur-paraiste ; flux de matière) joué par ce compartiment.

Cellamare, M. **2005**. Dynamique et diversité du phytoplancton des lacs Léman, d'Annecy et du Bourget : du pico- au microphytoplancton avec tentatives d'isolement systématique et identification des espèces. Rapport de Master de l'Université de Paris 6 (**Direction : Stéphan Jacquet**)

Un des objectifs à moyen-long terme de ce projet serait aussi d'évaluer la possibilité d'utiliser le picoplancton comme marqueur des changements naturels ou anthropiques en lac en proie à des changement climatiques globaux (augmentation des températures, accroissement de la dose des ultraviolets dans les eaux de surface) et à une eutrophisation des milieux grandissante ou à l'inverse à une restauration de ces écosystèmes. A plus court terme, le picoplancton pourrait jouer un rôle de sentinelle signalant les changements dans la manière les nutriments sont recyclés et les flux d'énergie au travers du réseau trophique. Il est à noter également que la mise en culture et le maintien de ces différentes microalgues sera d'une grande utilité pour le projet virus de microalgues car le « screening » de virus lytiques de principales formes phytoplanctonique de nos lacs pourra être réalisé.

Photographie montrant la mise en culture en chambre thermostatée et dans un mélange de milieux nutritifs des populations triées et isolées par cytométrie en flux.

Sil fallait conclure sur cette partie portant sur la diversité, je dirai que l'on a vu dans les quelques lignes précédentes qu'une technique seule n'est pas suffisante en soi et que c'est la complémentarité des approches classiques et plus modernes (dont moléculaires) qu'il faut mettre en avant. Le découplage des approches moléculaires et classiques (incluant les méthodes expérimentales) dans le domaine de la microbiologie environnementale n'a que peu d'avenir et il a déjà montré combien il était infructueux. A l'évidence, c'est ce couplage qui représente l'un des défis majeurs dans le domaine de l'écologie des microorganismes aquatiques dans les prochaines années pour notre groupe. Notre équipe peut se vanter d'être dans cette ligne de conduite et le développement de nouvelles méthodes type CARD-FISH en association avec la cytométrie en flux et la DGGE devraient bientôt voir le jour, travail dans lequel je serai fortement impliqué. Je vais aussi acquérir la technique PFGE pour appréhender la diversité virale globale. Je gage aussi sur l'importance de la RT-PCR qui devrait permettre aussi de s'intéresser à la diversité de groupes spécifiques et de les quantifier dans le milieu naturel, typiquement les cyanophages.

Le développement et l'utilisation de toutes ces techniques au sein de notre équipe justifient aujourd'hui le recrutement d'un technicien spécialiste en microbiologie. J'ai participé à l'écriture du profil de poste en avril 2005 et nous espérons que cette demande aboutira en 2006. Comme cela a été spécifié plus haut, j'essayerai en 2006 d'obtenir le recrutement d'un chercheur post-doctoral sur la problématique des virus de microalgues. Un contact très sérieux existe déjà Marjolijn TIJDENS qui effectue sa thèse en Hollande et que j'ai rencontré pendant mon workshop à Thonon-les-Bains.

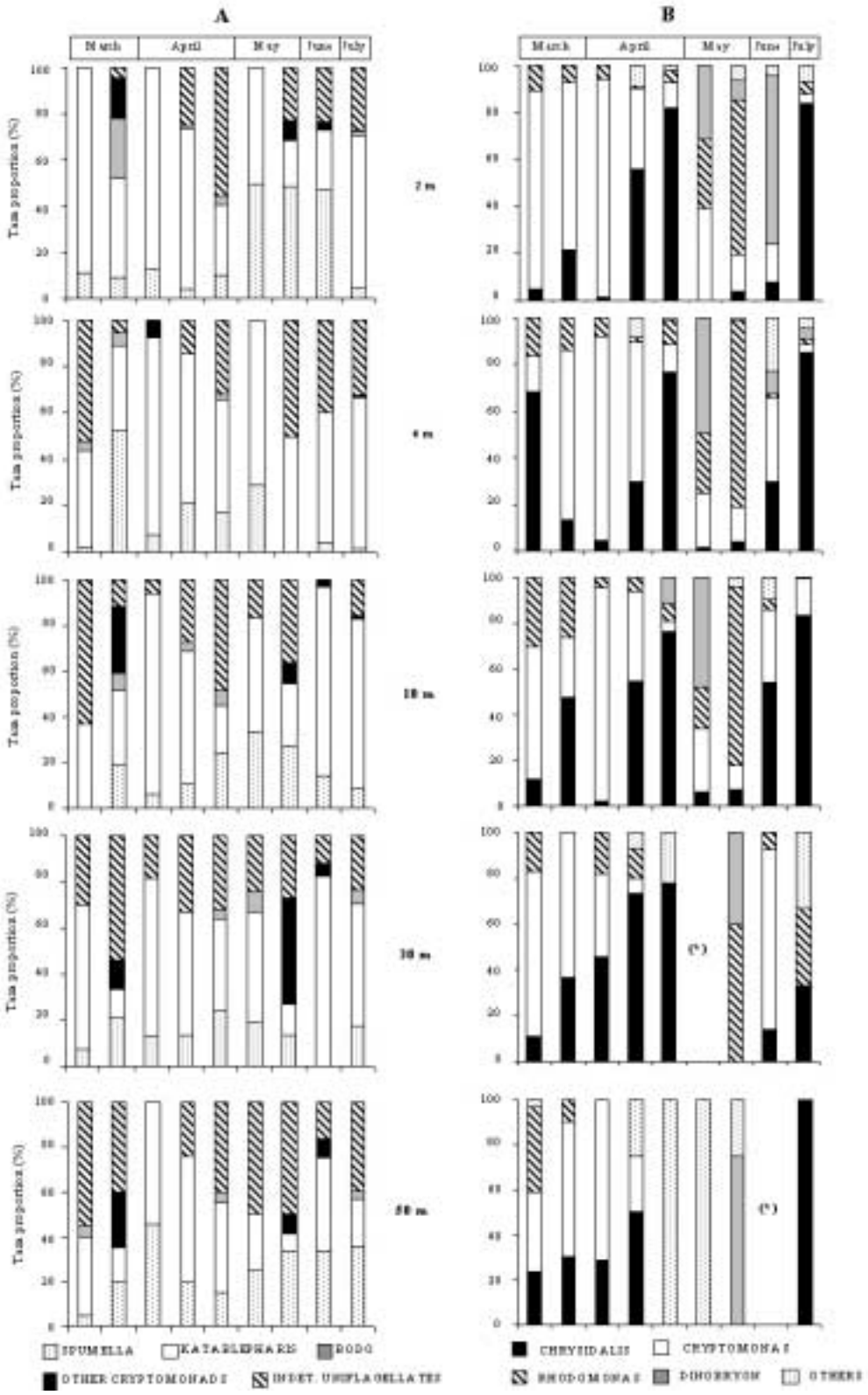


Figure 12: Changements saisonniers de la composition taxonomique des flagellés hétérotrophes (A) et pigmentés (B) à 5 profondeurs entre mars et juillet 2002. Figure extraite de Comte et al. (in press)

II.1.3. Activité et production bactériennes

En 2004 et 2005, ces paramètres ont été et sont mesurés pour 4 profondeurs (2, 10, 15 et 30 m) de la colonne d'eau du lac du Bourget tous les 15 jours environ. La **figure 13** ci-dessous permet de suivre les valeurs de thymidine produite pour les 4 profondeurs au cours de l'année 2004. Ces

données seront exploitées à la fin de l'année 2005 et les liens avec la température et la production primaire seront vérifiés, en raison du fait que les plus fortes valeurs sont mesurées entre juillet et septembre en surface et que les activités semblent diminuer vers la profondeur de l'écosystème. Il apparaît aussi que les valeurs sont proches des celles habituellement rapportées dans les milieux mésotrophes (Bettarel et al. 2003). L'utilisation de facteurs de conversion adéquats nous permettra aussi de raisonner en terme de cellules produites ou de matière formée sous forme de carbone et de comparer nos résultats avec ceux décrits dans la thèse de Sylvie VIBOUD.

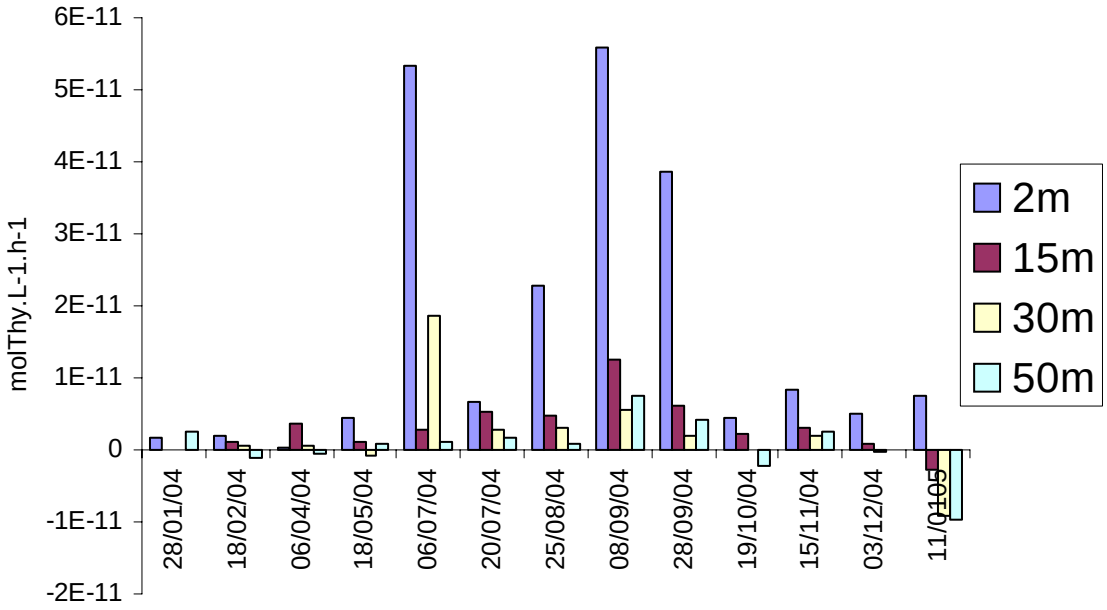


Figure 13 : Changements saisonniers de la production bactérienne du lac du Bourget mesurée par incorporation de thymidine radioactive pour 4 profondeurs. Les incubations ont été faites *in situ* pendant au moins 2 heures.

La production bactérienne a aussi été mesurée pendant deux campagnes que j'ai organisées sur le lac du Bourget aux mois de juin et décembre 2004 au cours de deux cycles nycthéméraux. Pendant 48 heures, nous avons opéré en baie de Grésine des prélèvements et des incubations toutes les 6 heures. L'exploitation et la valorisation de l'ensemble des résultats portant sur les abondances virales, bactériennes et phytoplanctoniques, les concentrations en nutriments dont le carbone organique dissous, la production bactérienne, l'impact de la lyse virale et de l'importance de la lysogénie ont été confiés à Télesphore SIME-NGANDO (choix personnel). Ce futur article permettra d'alimenter le projet ECCO VIRULAC déposé et obtenu par Télesphore, et dans lequel je suis le seul partenaire.

Sime-Ngando, T., I. Domaizon, S. Personnic and **S. Jacquet. 2005**. Diel patterns of microbial community structure and viral functioning in Lake Bourget. (en préparation)

II.2. L'impact des virus et des protozoaires sur la mortalité des communautés bactériennes

L'écologie des communautés, au travers des interactions biotiques au sein des communautés d'espèces partageant le même habitat, et des échanges avec le milieu physique, est une composante importante de l'étude des écosystèmes. Il est important de quantifier les flux et les transferts de matière et d'énergie au sein des écosystèmes, préciser le rôle et l'activité des organismes vivants organisés en populations ou communautés dans ces flux et transferts, et caractériser la dynamique à long terme de ces écosystèmes. C'est un des champs thématiques du département *Ecologie des Forêts, Prairie et milieux Aquatiques* de l'INRA dans lequel mes travaux trouvent toute leur place. Sous cet angle, les communautés microbiennes sont étudiées pour préciser leur contribution au fonctionnement des écosystèmes (productivité, cycles biogéochimiques). Ainsi travaillé-je sur les processus biologiques impliqués dans les flux de matière et d'énergie et à l'avenir sur leurs modifications en réponse aux perturbations naturelles. La réponse aux perturbations sera en effet étudier très prochainement en s'intéressant à l'impact du rayonnement UV sur le fonctionnement de la boucle microbienne lacustre (projet innovant financé par EFPA en 2005 – voir plus loin).

De mars à juillet 2002, nous avons pu distinguer très clairement l'existence de 3 périodes dans le fonctionnement de la boucle microbienne de l'épilimnion du lac du Bourget. Au début du printemps, les flagellés mixotrophes et hétérotrophes constituaient les prédateurs principaux des bactéries et étaient régulés par la disponibilité en ressources surtout en avril (1). Une fois que la phase des eaux claires était établie, la pression de prédation par le métazooplancton représentait une important contrôle par le haut (top-down control) sur les différents compartiments microbiens. Pendant cette période, seulement les flagellés mixotrophes exerçaient occasionnellement une prédation significative sur les bactéries (2). Finalement, le début d'été était caractérisé par la pression de prédation la plus élevée par les protozoaires sur les bactéries et par un changement rapide dans la voie de transfert du carbone avec de nouveau l'importance des flagellés hétérotrophes et mixotrophes ainsi que les ciliés. La forte abondance des ciliés pendant cette dernière période était en accord avec la forte densité des ressources en flagellés et bactéries auto- et hétérotrophes et autres formes phytoplanctoniques, surtout dans les eaux du maximum de chlorophylle. Les bactéries, comme les ciliés, répondaient clairement à l'augmentation d'abondance du phytoplancton, et bien que le broutage des bactéries pouvait varier très largement, l'abondance bactérienne semblait essentiellement contrôlée par les ressources nutritives (3)(**Figure 14**).

Sur ce même lac du Bourget, en plus du suivi de la dynamique des communautés microbiennes planctoniques, nous avons réalisé au cours de l'année 2003, trois fois la même série d'expériences consistant à estimer l'impact de la prédation des protozoaires et des virus sur la mortalité bactérienne. Ces expériences ont été menées en mars-avril (exp1), en mai (exp2) puis en août

(exp3). Les abondances bactériennes et virales ont été obtenues par cytométrie en flux et celles des protozoaires flagellés et ciliés par microscopie à épifluorescence. Une approche consistant à diluer avec de l'eau du lac purifiée les échantillons préalablement filtrés pour éliminer les prédateurs potentiels des bactéries a été utilisée et a permis d'estimer que la lyse virale pouvait être responsable de 60% (exp1), 35% (exp2) et 52% (exp3) de la mortalité bactérienne journalière (**Figure 15**). Le broutage des flagellés (hétérotrophes et mixotrophes) estimé à partir des échantillons bruts était responsable de 56% (exp1), 63% (exp2) et 18% (exp3) de la mortalité bactérienne journalière. Ces résultats ont donc révélé que la lyse virale et le broutage par les flagellés avaient un fort impact sur la mortalité bactérienne et que cet impact changeait de manière significative au cours du temps dans les eaux de surface. L'utilisation en parallèle de la microscopie électronique à transmission a permis de trouver des charges virales de 9 à 25 (exp1), 10 à 35 (exp2) et de 8 à 25 (exp3), un pourcentage de cellules bactériennes infectées de 5,7% (exp1), 3,4% (exp2) et de 5,7% (exp3) amenant à une estimation pour la mortalité bactérienne induite par lyse virale de seulement 6,3% (exp1), 3,7% (exp2) et 6,3% (exp3). Bien que nous ayons obtenu les mêmes tendances pour les résultats obtenus en cytométrie avec la méthode de dilution et en microscopie électronique quant à l'impact des virus sur les bactéries (r2=0,9), il est apparu très nettement que les deux méthodes conduisaient à des estimations très différentes. Dans l'article publiant ces résultats (Jacquet et al. 2005), nous avons donné les raisons possibles à ces différences observées.

Faisant suite à ces résultats portant sur la comparaison de méthodes et les différences trouvées entre les résultats, j'ai proposé une inter-calibration pour le comptage des particules virales et des cellules bactériennes en décembre 2004. 16 échantillons prélevés sur 3 jours à différentes profondeurs et à différentes heures du jour et de la nuit ont été analysés par 4 personnes différentes et par 3 techniques différentes. Les résultats ont révélé une absence totale de corrélations posant très sérieusement la question de validité des données (abondances) obtenues, de la raison de la comparaison de nos propres chiffres avec ceux trouvés dans la littérature. Toutefois, il est fort probable que l'absence de corrélations satisfaisantes soit en partie due aux faibles variations enregistrées dans les abondances à cette période de l'année. Cette inter-calibration sera donc refaite cet été de façon à travailler avec des abondances plus élevées et augmenter le nombre total d'échantillons.

Le même type d'approche que celle utilisée sur le lac du Bourget et présentée ci-dessus a été mise en oeuvre sur le lac Léman pendant le stage de MASTER2 de Solange DUHAMEL. Ce travail rapportait pour la première fois l'étude de la dynamique des communautés microbiennes (des virus aux ciliés) et le résultat d'expériences réalisées *in situ* destinées à estimer la part relative de la prédation par les protozoaires flagellés et l'impact des virus sur la mortalité bactérienne. Ces expériences ont été conduites en mars-avril (Exp1) et en mai (Exp2) 2004. Les nanoflagellés et les

virus étaient responsables de 31 à 42% de la mortalité bactérienne journalière. En mai, les virus expliquaient 10% de la mortalité bactérienne et les nanoflagellés 32%. A l'évidence, les résultats étaient très différents entre le lac Léman et le lac du Bourget, pourtant caractérisé par le même statut trophique. Là encore, la question est posée de la validité des comparaisons entre des écosystèmes supposés être très proches ou à l'inverse très différents (trophiquement parlant). Bien sur, un résultat ponctuel ne nous permet pas aujourd'hui de tirer de conclusions.

L'ensemble des données (encore très peu nombreuses) obtenu à ce jour sur les Lacs Léman et du Bourget permet néanmoins de s'intéresser à une autre question particulièrement importante, celle du lien entre les différentes communautés et de l'impact direct ou indirect des unes sur les autres. Typiquement, la « dissection » des données de la microscopie électronique à transmission et de la cytométrie en flux semble révéler qu'il existe un couplage étroit entre l'impact des virus sur la mortalité bactérienne et la présence/absence des prédateurs flagellés. En résumé, j'ai pu tester l'importance de la présence ou de l'absence des prédateurs flagellés sur l'action virale sur ces deux lacs au cours de 5 expériences différentes. Presque à chaque fois, j'ai remarqué que la lyse virale était favorisée en présence des flagellés, jusqu'à 9 fois plus par exemple fin mars dans le lac du Bourget, et dans un laps de temps très court (24 à 96h). Je suis en cours d'exploitation de ces résultats pour tenter de donner des explications à ces observations d'une importance capitale dans le fonctionnement de la boucle microbienne.

Domaizon, I., U. Dorigo, S. Personnic, J. Comte, A. Mbade Sene, A. Millery, D. Fontvieille and **S. Jacquet**. **2004**. Assessment of protozoan predation impact on aquatic bacteria: *in situ* experimental approaches. Communication orale au 1st Workshop on Freshwater microbial ecology: comparison of methods for measuring activity and interactions among microorganisms, Pallanza, Italy, October 2004

Duhamel, S., I. Domaizon, S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Assessing the microbial community dynamics and the role of viruses as bacterial mortality agents in Lake Geneva. *La Revue des Sciences de l'eau (accepté)*

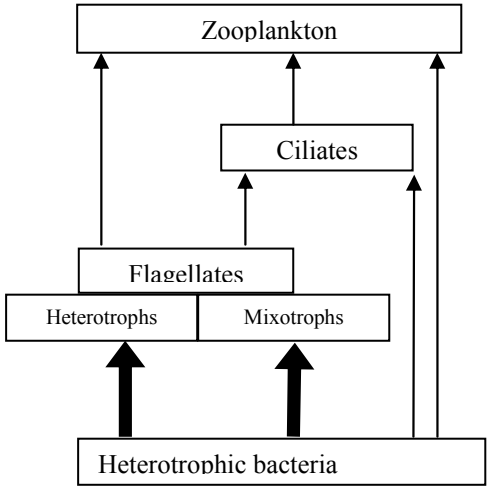
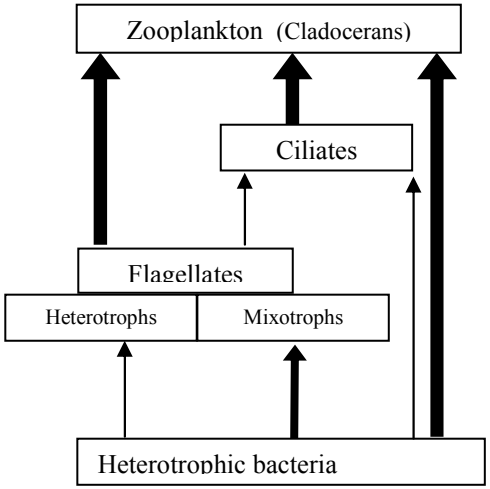
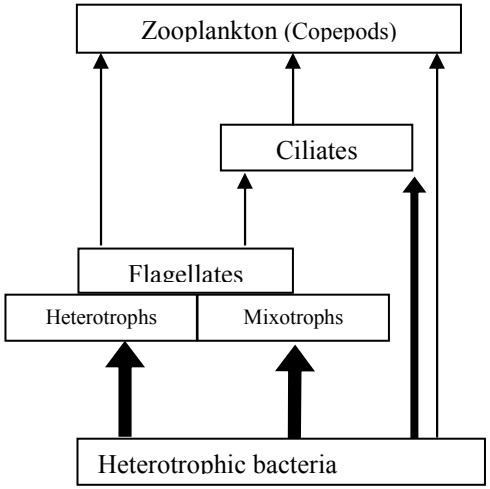
Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, S. Duhamel, A. S. Pradeep Ram, M. Heldal and T. Sime-Ngando. **2005**. Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Fresh. Biol. 50: 627-645*

Jacquet, S., S. Personnic, I. Domaizon, T. Sime-Ngnado. **2005**. Counting aquatic bacteria and viruses: are methods comparable? *En preparation*

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, U. Dorigo and T. Sime-Ngnado. **2005**. Grazing influences virus-induced bacterial mortality within short-time scales. *En préparation*

La technique de dilution pour apprécier l'impact des virus et des prédateurs planctoniques sur les compartiments bactériens et/ou phytoplanctonique me parait une méthode de choix à appliquer dans les années à venir. Nous avons été les premiers à publier cette technique en 2003 avec Claire Evans et encore les premiers en milieu lacustre pour le compartiment bactérien. Certes, la méthode a des contraintes et des limites mais elle reste une des plus simple à utiliser in situ. Je pense l'utiliser dans un proche avenir sur le lac d'Annecy pour lequel nous n'avons à ce jour aucune donnée sur le rôle des virus comme agents de mortalité bactérienne et/ phytoplanctonique. Dans ce milieu oligotrophe, il sera pertinent en parallèle de s'intéresser à la redistribution de la matière, au recyclage des nutriments suite à la lyse virale et à la question de savoir qui profite de cette manne nutritive et comment. Tout un programme !

La Figure 15 ci-dessous montre le scénario conceptuel pour la succession des bactérivores et pour la structure de la boucle microbienne dans l'épilimnion (0-10 m) du lac du Bourget entre Mars et juillet 2002.

	Early spring (March –April)	Clear water phase (May)	Early summer (June – July)
Conceptual scheme for upper layers (2, 6, 10 m depth)			
[Chlorophyll *a*]	Peak on 2 April (2m)	Low values	Increase - peak on 3 July (6m)
[Heterotrophic Bacteria]	moderate values	Increase	high values
[Bacterial Filaments]	Peak on 22 April	Low values	Peak on 19 June
Bacterial groups proportion	Dominance of CF	Dominance of CF	Increase of α and β proteobacteria
% FDC (bacterial production)	highest values	lowest values	low values
Protozoan grazing	- Moderate to high flagellates grazing rates - Low ciliates grazing impact	- Mainly mixotrophic flagellates predation - Low ciliates and heterotrophic flagellates grazing impact	peak on 3 july - Highest flagellates grazing rates - Large increase in ciliates predation
Regulation pressure *TD : Top Down control* *BU : Bottom Up control*	Bacteria regulation : mainly BU (grazing rates lower than bacterial production) Protozoan regulation : mainly BU, especially during April	Bacteria regulation : probably simultaneous BU control and TD control due to metazooplankton Protozoan regulation : mainly TD	Bacteria regulation : mainly BU control although high protozoan predation Protozoan regulation : mainly BU for flagellates (2 and 6m) and ciliates Mainly predation for flagellates at 10m

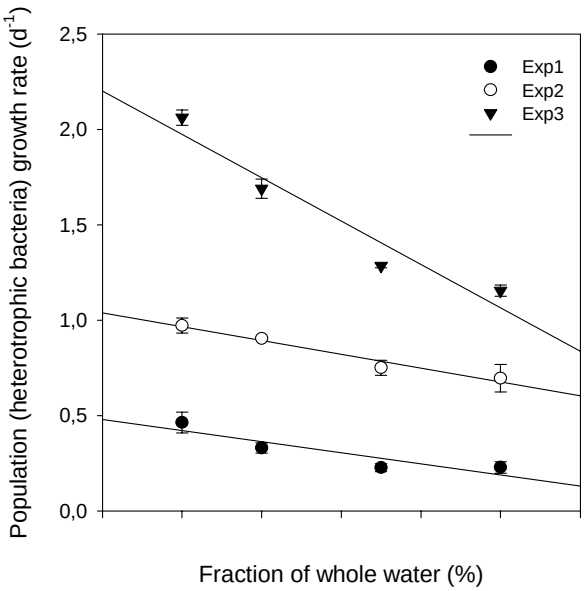


Figure 15 : Courbes issues des analyses des taux de croissance en absence de prédateurs et en présence d'une concentration variable de virus. Les équations des différentes courbes sont les suivantes: Exp1: y = 0.4791 - 0.2889x (r^2 = 0.93); Exp2: y = 1.0385 - 0.3617x (r^2 = 0.98) et Exp3: y = 2.2012 - 1.1366x (r^2 = 0.99). Figure extraite de Jacquet et al. (2005).

S'il fallait donner quelques éléments de conclusion sur cette partie concernant le rôle des virus en milieu aquatique, je dirai que nous avons commencé à nous intéresser au rôle de ces agents de mortalité microbienne comme bon nombre de laboratoires. L'impact des virus sur la biodiversité et ses changements a aussi fait l'objet de quelques études mais il constitue encore un défi majeur pour les années à venir. L'acquisition de la PFGE nous permettra de suivre l'évolution de la diversité virale en plus de la diversité bactérienne par DGGE en réponse aux fluctuations de l'environnement ou dans le cadre d'expérimentations *in situ* portant sur les relations trophiques ou l'impact de facteurs environnementaux clefs comme les UV. Plus important encore, me semble t-il, est le manque cruel de données quantitatives portant sur l'impact de la lyse des cellules imputable aux virus sur la libération et le recyclage des éléments nutritifs. La nature de ces éléments est-elle la même que les molécules inorganiques que nous avons l'habitude de mesurer ? Ces macronutriments, probablement complexes, devraient-ils accroître la disponibilité en nourriture pour certains microorganismes et la décroître pour d'autres ? Quel est le lien entre ces nutriments, la diversité et ses changements dans le temps et l'espace ? Je gage sur l'importance que les recherches à venir devront donner à cette problématique car l'impact sur le fonctionnement des écosystèmes pourrait être fondamental. Nous nous intéresserons dans les années à venir aussi bien aux virus de procaryotes (bactéries et picocyanobactéries) qu'aux virus de microalgues eucaryotiques.

II.3. Autres travaux : l'écologie des efflorescences cyanobactériennes

Pour des raison évidentes de temps, et pour éviter de tout faire à moitié, je me suis doucement détaché de la thématique « cyanobactéries » pendant l'année 2004 portée par Jean-François HUMBERT. Ne pouvant néanmoins ignorer totalement cette problématique, je continue à m'investir de manière sporadique, souvent à la demande, et si cela est nécessaire mais aussi parce que cette problématique intéresse le lac du Bourget et qu'elle a forcément des liens avec la compréhension de la boucle microbienne. Mais clairement, je n'initie plus aucune démarche en terme de projets. Mon seul intérêt dans l'avenir sera le rattachement à une problématique « virale » car par exemple aucun virus de cyanobactérie filamenteuse telle que celle décrite plus bas n'a été isolé à ce jour. Les résultats des travaux dans lesquels j'ai été impliqué sont résumés ci-dessous.

Alors que le lac du Bourget connaît une amélioration de la qualité de ses eaux (diminution des charges en phosphates depuis le milieu des années 80), il est néanmoins le siège depuis 1997 de proliférations plus ou moins pérennes de la cyanobactérie filamenteuse et toxique *P. rubescens*. La recherche des facteurs et processus impliqués dans le déterminisme de cette prolifération a fait l'objet à la fois de suivis sur le terrain et d'approches en laboratoire. A partir des suivis bimensuels de terrain et de l'analyse des séries chronologiques disponibles, nous avons pu montrer que les proliférations de *P. rubescens* qui débutent toujours dans la couche supérieure du métalimnion en été, étaient sans doute liées à une augmentation de la transparence des eaux suite à l'avance du développement phytoplanctonique printanier et de moindres développements algaux en été dans l'épilimnion. La grande stabilité de la colonne d'eau du lac du Bourget semble aussi constituer un processus majeur qui permet notamment de comprendre pourquoi le lac Léman et le Bourget, qui présentent pourtant des niveaux trophiques et une diversité phytoplanctonique très comparables, ne connaissent pas les mêmes successions phytoplanctoniques. Le simple calcul d'un coefficient de stabilité de l'épilimnion révèle en effet que les conditions sont toujours favorables au développement de la cyanobactérie sur le lac du Bourget mais pas sur le lac Léman. Enfin, c'est le « global change », caractérisé notamment par une augmentation significative des températures moyennes hivernales au cours des deux dernières décennies, qui semble intervenir dans la précocité des développements phytoplanctoniques au printemps et à la mise en place de l'efflorescence estivale à *P. rubescens*.

Parmi les facteurs qui peuvent expliquer la dominance et la prolifération d'une espèce comme *P. rubescens*, la lumière et la température occupent une place de choix. Ainsi, nous avons testé au laboratoire l'effet de la quantité et de la qualité de la lumière sur la croissance de cette cyanobactérie et de sa forme verte : *P. agardhii* sous différentes conditions de température. Ces expérimentations ont permis de préciser les avantages sélectifs de *P. rubescens*, forme rouge car

riche en phycoérythrine, par rapport à sa forme verte, *P. agardhii*. Typiquement, il a été montré que la croissance de *P. rubescens* est favorisée en conditions de lumière verte, corroborant les observations faites sur le terrain. Les optima de croissance à différentes températures ont également révélé une grande plasticité chez cette espèce capable de pousser dans une gamme très large de température. Ainsi, ces facteurs permettent en partie d'expliquer la raison du succès de développement *de P. rubescens* dans le lac du Bourget. Aujourd'hui, sur la base de nos travaux et en consultant la littérature, nous pouvons dire que l'efflorescence de *P. rubescens* s'explique pour les raisons suivantes :

- il s'agit d'une forme filamenteuse toxique : elle est donc peu broutée par les prédateurs potentiel ;
- aucun virus n'a été isolé à ce jour en dépit de différentes tentatives : cela laisse supposer un contrôle par les virus très faible ;
- les taux de croissance mesurées chez cette cyanobactéries sont les plus faibles trouvés dans cette famille d'organismes : elle s'adapte donc très facilement à des conditions nutritives limitantes et pousse doucement mais sûrement ;
- son développement dans les couches intermédiaires est directement lié à son contenu pigmentaire (phycoérythrine) qui lui donne un avantage sélectif sur les autres organismes pour utiliser les longueurs d'onde de la lumière (lumière verte) qu'elle seule peut utiliser ; elle accède à la lumière en raison de la relative transparence des eaux de l'épilimnion liée ces dernières années à l'avance du développement phytoplanctonique printanier et de moindres développements algaux en été dans cette couche de surface ;
- *P. rubescens* a besoin d'une stratification marquée de la colonne d'eau pour entamer son développement : le lac du Bourget lui fournit ce type de conditions chaque année ce qui n'est pas forcément le cas du lac Léman où ces développements sont globalement moindres ;
- *P. rubescens* est capable de consommation de luxe et se contente pour pousser de concentrations en Phosphore très faibles pendant longtemps : le statut mésotrophe du lac du Bourget n'est donc pas limitant à sa croissance et il est soupçonné que le fonctionnement de la boucle microbienne, donc à micro-échelle, lui fournisse les éléments nutritifs nécessaires à sa croissance en période d'apparente disette. De plus, *P. rubescens* est capable d'utiliser des sources de carbone pour croître.

En plus de l'étude de la dynamique des populations de *P. rubescens*, l'hétérogénéité spatiale de la distribution des grands groupes phytoplanctoniques dont *P. rubescens* a été étudiée au travers de l'analyse de 11 points du lac. En 2002 et 2003, en effet, un essai de description de la dynamique et de la variabilité spatiale des communautés phytoplanctoniques a été réalisé à partir des analyses

obtenues au moyen d'une sonde spectrofluorimétrique immergeable. Jusqu'à cette date, l'essentiel des données obtenues sur les communautés phytoplanctoniques du lac du Bourget ne l'était qu'au point B, point de référence au milieu du lac. Or les théories de l'écologie et notamment celles qui posent les problèmes de l'échantillonnage et de l'hétérogénéité spatiale nous enseignent que l'échantillonnage en un point discret ne peut donner qu'une information partielle voire erronée dans certains cas. Ainsi, pour avoir une meilleure idée de la dynamique des populations phytoplanctoniques à l'échelle du lac, un effort d'échantillonnage a été décidé au travers de ces 11 sites d'observation. A première vue, on n'observait pas de grande hétérogénéité dans la distribution horizontale du phytoplancton et des bactéries dans la zone pélagique du lac du Bourget à l'échelle annuelle. Dans le détail néanmoins, et en s'intéressant de plus près à la distribution de *P. rubescens* à l'échelle du lac, des variations spatiales importantes ont pu être détectées entre le nord et le sud du lac tant du point de vue de la structuration verticale qu'horizontale. Typiquement, en août 2002 et 2003 ou encore en novembre 2002, les pics de biomasse de la cyanobactérie pouvaient varier de 6 à 9 m dans la colonne d'eau s'étalant entre 10 et 20 mètres de profondeur. Ces variations épisodiques semblent pouvoir être expliquées simplement par les variations enregistrées dans la structure physique (révélées par les profils de température) et les ondes internes (seiches) caractéristiques du lac. Ces données ont donc suggéré un lien étroit entre la physique et la biologie dans le lac du Bourget. D'un point de vue pratique, ces résultats ont surtout montré qu'utiliser un seul point de prélèvement au milieu du lac peut ne pas être suffisant pour décrire la structure des communautés et parler de qualité des eaux car il est possible de passer à côté de l'information, surtout à partir de prélèvements discrets faits à la bouteille fermante. Ainsi l'utilisation d'outils comme des sondes spectro-fluorimétriques, qui permettent d'obtenir des profils entiers de la colonne d'eau et de décrire les grands groupes phytoplanctoniques présents, trouvent ici toute leur valeur et nous avons optimisé l'utilisation de l'une d'elles.

Comme cela a été spécifié plus haut, *P. rubescens* est une cyanobactérie toxique et nous nous sommes donc intéressés avec Jean-François BRIAND, post-doctorant, à la caractérisation des toxines de cette cyanobactérie et du contrôle environnemental sur leur production entre 1999 et 2002 sur le lac du Bourget. En utilisant la chromatographie liquide couplée avec diode de détection UV et un spectromètre de masse, nous avons trouvé que deux variants principaux de la microcystine-RR ([D-Asp^3] and [D-Asp^3, Dhb^7] microcystins-RR) étaient produits. La proportion de ces deux variants n'était pas influencée par la profondeur ou la période d'échantillonnage. Exprimées sous la forme d'équivalent microcystine-LR (qui est le standard pour ces formes toxiniques), de fortes concentrations étaient enregistrées d'août à décembre chaque année, atteignant des valeurs de 6,7 $\mu g.l^{-1}$. D'après l'OMS (organisation mondiale de la santé), le risque et

les procédures à mettre en place en terme de protection commence à la valeur seuil de 1 $\mu g.l^{-1}$! Une corrélation très nette était trouvée entre le contenu en microcystine des cellules et les densités cellulaires de *P. rubescens*. Les quotas cellulaires évoluaient entre 0,1 et 0,3 $pg.cell^{-1}$. Simultanément, des expériences au laboratoire ont été conduites sur une souche de *P. rubescens* isolée du lac du Bourget dans le but d'évaluer l'impact des concentrations en orthophosphates sur la croissance de cette souche et de sa production de toxines intra- et extracellulaires. Comparativement aux populations naturelles, cette souche ne produisait qu'un seul variant, la [D-Asp^3] MC-RR. Le contenu des cellules en MC était similairement corrélé à la densité cellulaire mais le quota était légèrement supérieur (0,3 à 0,7 $pg.cell^{-1}$) à celui trouvé pour les populations du lac. Là encore, une relation linéaire existait entre le taux de croissance et le taux de production des toxines. L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que les facteurs environnementaux n'ont probablement pas un effet direct sur la production de toxines mais un effet indirect au travers du taux de croissance qu'ils affectent.

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maisonnette, B. Leberre and J.-F. Humbert. **2005**. Variations in the microcystins production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed by a four years in situ survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. *Microb. Ecol. (sous presse)*

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois et J.-F. Humbert. **2005**. Influence des conditions environnementales sur la production de microcystines par *Planktothrix rubescens* (cyanobactérie). Communication orale au 2nd Colloque d'Ecologie Microbienne, Obernai, France, mai 2005

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maisonnette, C. Freissinet, B. Leberre, J.-P. Bosse and J.-F. Humbert. **2004**. Variations in the microcystins production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed by a four years *in situ* survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. Communication orale au VI International Conference on Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norvège, June 2004

Briand, J.-F., L. Oberhaus , C. Leboulanger, **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2003**. Croissances comparées de deux cyanobactéries : *Planktothrix agardhii* et *P. rubescens* soumises à diverses quantités et qualités de lumière. Poster à la CILEF, Montréal, Canada, Juillet 2003

Briand, J.-F., L. Oberhaus, J.-F. Humbert, C. Leboulanger et **S. Jacquet**. **2003**. Etude de l'influence de la qualité et de la quantité de lumière sur la croissance de *Planktothrix rubescens* et *P. agardhii* (cyanobacteria). Poster aux Conférences INRA sur la Microbiologie, Paris, France, Mai 2003

Freissinet, C., A. Cabal, C. Guilbaud, J.-F. Humbert, **S. Jacquet**, C. Leboulanger, A. Groleau, C. Quiblier, F. Prévot, B. Tassin, B. Vinçon-Leite and G. Paolini. **2003**. SACYTOX: an alert system prototype for early detection of cyanobacterial blooms. Communication orale au 3rd Symposium for European Freshwater Sciences, Edinburgh, UK, July 2003

Freissinet, C., O. Bertrand, J.-F. Humbert, **S. Jacquet**, A. Groleau, F. Prévost, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, N. Zervos, G. Paolini and A-B. Delmas. **2004**. Prototype warning system for toxic cyanobacteria oproliferation in lakes: diagnostic and forecasting (SACYTOX). Poster au 6th Water Symposium, Cannes, France, June-July 2004

Humbert, J.-F., C. Leboulanger, **S. Jacquet**, U. Dorigo, B. Leberre and G. Paolini. **2002**. Use of a submersible spectrofluorometer in cyanobacterial monitoring programs: The example of Lake Bourget. Communication orale au Harmful Algal Bloom Congress, St Petersburg, USA, October 2002

Jacquet, S., J.-F. Briand, C. Leboulanger and J.-F. Humbert. **2002**. A toxic cyanobacterial bloom in response to re-oligotrophisation: an unexpected consequence of lake restoration? Communication orale au 8th Symposium of Aquatic Microbial Ecology, Taormina, Italy, October 2002

Jacquet, S., J.-F. Briand, C. Leboulanger, C. Avois-Jacquet, G. Paolini, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, J.-C. Druart, O. Anneville and J.-F. Humbert. **2005**. The proliferation of the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae 4: 651-672*

Jacquet, S., B. Leberre, G. Paolini and J.-F. Humbert. **2004**. Variations in the spatial distribution of Planktothrix rubescens in lac du Bourget (France). Poster au 6th International Congress on Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway, June 2004

Leboulanger, C., U. Dorigo, **S. Jacquet**, B. LeBerre, G. Paolini and J.-F. Humbert. **2002**. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol. 30:83-89*

Oberhaus, L. J.-F. Briand, C. Leboulanger, **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2005** Comparative effects of light quantity and quality on growth of the two cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *En préparation*

Oberhaus, L, J.-F. Briand, J.-F. Humbert, **S. Jacquet**, C. Leboulanger, B. Tassin, B. Vinçon-Leite and N. Zevros. **2003**. L'écologie de *Planktothrix rubescens* dans le lac du Bourget et le lac Léman: dynamique *in situ*, expériences en laboratoire et modélisation. Communication orale au GRISCYA, Paris, France, novembre 2003

Oberhaus, L, C. Avois-Jacquet, J.-F. Briand, J.-F. Humbert, **S. Jacquet**, G. Paolini, B. Leberre, C. Leboulanger, B. Tassin, B. Vinçon-Leite and N. Zevros. **2003**. The ecology of *Planktothrix rubescens* in Lake Bourget and Lake Geneva: *in situ* dynamics, laboratory experiments, and modelling. Communication orale à l'ENS Paris, France, June 2003

III. PERSPECTIVES

III1. Un projet innovant portant sur l'impact des UV sur la boucle microbienne du lac du Bourget, financé en 2005 par le département EFPA de l'INRA

Les ultraviolets naturels (UV), comme l'ensemble des facteurs environnementaux, ont potentiellement un rôle important dans la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes qui se développent dans la couche superficielle des écosystèmes aquatiques. En raison de leur pouvoir énergétique, les UV affectent les organismes directement (effets délétères sur la biologie [mutation, mortalité]) ou indirectement au travers des modifications de la structure et de la composition de la matière organique dissoute (MOD). Nous sommes donc en présence d'un descripteur de l'environnement pouvant affecter significativement les cycles biogéochimiques en milieu aquatique. Cependant, on ne sait rien aujourd'hui de l'impact du rayonnement UV sur les abondances, activités, diversité et interactions entre les compartiments clefs (virus, bactéries, protistes) qui sont à la base des réseaux trophiques des grands lacs naturels français et comment, plus globalement, la MOD dans les écosystèmes est influencée par ces radiations. Cette constatation est aussi vraie au delà du territoire français, à l'échelle Européenne où très peu d'études ont été

réalisées à ce jour. Les enjeux scientifiques évoqués ci-dessus sont très bien résumés dans deux ouvrages scientifiques récents parus en 2000 et 2003, intitulés « The effects of UV radiation in the marine environment » et « UV effects in aquatic organisms and ecosystems ». La lumière est un facteur clef dans la plupart des processus biologiques terrestres et aquatiques. Toutefois, des plages spécifiques de la lumière comme les UV (280-400 nm) fonctionnent à la fois comme un accélérateur de la dégradation microbienne en favorisant la bio-disponibilité des substrats organiques complexes mais aussi par la photo-lyse et l'oxydation de certains composants macromoléculaires organiques. La découverte relativement récente de la réduction de la couche d'ozone stratosphérique aux moyennes latitudes a mis en avant les risques liés à l'accroissement du rayonnement ultraviolet sur la surface terrestre, mais force est de constater que les effets (délétères) du rayonnement UV (surtout les UV-B : 280-320 nm) sur les systèmes vivants (typiquement les microorganismes) et les interactions inter-, intra- et infraspécifiques ne sont pas encore bien établis/documentés. Si les conséquences pour les organismes auto- et hétérotrophes en réponse au rayonnement UV et son accroissement possible sont donc incertains, il n'en est pas moins attendu que les modifications de l'activité/dynamique microbienne puissent avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement global des écosystèmes aquatiques (changements dans les cycles biogéochimiques, structure des communautés, dynamique et diversité des réseaux trophiques, etc). Des expériences ont été menées sur le lac Majeur en Italie situé approximativement à la même latitude que le lac du Bourget et les résultats sont très contradictoires. Ils ont révélé néanmoins une forte inhibition des activités cellulaires en réponse aux UV-B et des capacités de réparation probablement du(es) à l'action des UV-A (320-400 nm). Qu'en est-il du plus grand lac naturel français ? Quelle est l'importance des radiations UV dans ce lac en terme d'intensité et d'étendue ? Comment les communautés microbiennes sont-elles affectées ? La réponse des populations est-elle hautement spécifique ?

Les UV peuvent inhiber la photosynthèse phytoplanctonique et affecter les processus microbiens au travers de l'inhibition de l'activité bactérienne ou des modifications de biodisponibilité des substrats inorganiques et organiques et des éléments traces. Il est largement reconnu que les UV interviennent au niveau des dommages subis par l'ADN des organismes mais qu'il existe aussi des systèmes de réparation eux même favorisés par l'action de la lumière (notamment les UV-A). Devant la complexité des réponses biologiques possibles face au rayonnement ultraviolet, mon projet se veut dans un premier temps simple de par son statut de recherche pionnière sur la question. Nous ne nous intéresserons qu'aux compartiments microbiens (les plus sensibles en théorie de par leur petite taille et des protections moindres) et aux modifications des concentrations et des indexes de qualité de la MOD. Les microorganismes que nous examinerons, en termes de dynamique et de diversité, iront des virus aux protistes (virus,

bactéries hétérotrophes, picophytoplancton, nanophytoplancton, flagellés et ciliés mixo- et hétérotrophes). Dans ce contexte les échantillons seront pré-filtrés sur 200 puis 60 µm pour éliminer les formes zooplanctoniques de grande taille et la MOD sera quantifiée après filtration sur 0,45 ou 0,2 µm.

Dans le cadre de ce projet, nous avons proposé de travailler *in situ* en incubant dans des bouteilles en quartz (entourées ou pas de filtre permettant la sélection et la discrimination des effets liés aux UV-A et UV-B) 2 litres d'eau prélevées dans diverses conditions (ces bouteilles viennent d'être faites par un verrier spécialisé). L'idée est de répéter ces expériences à différentes périodes clefs de l'année.

- Une première série d'expériences consistera, au mois de juillet, à incuber l'eau prélevée à différentes profondeurs dans différentes bouteilles, certaines étant transparentes aux UV. Elle permettra de vérifier l'action directe et séparée des UV-A et des UV-B en fonction de leur intensité décroissante avec la profondeur. En effet, la pénétration et l'intensité des UV dans la colonne d'eau varient en fonction des qualités optiques de la matière organique dissoute, de la concentration en phytoplancton et autres particules, et des propriétés optiques de l'eau elle-même.
- Une seconde série d'expériences consistera à replacer à différentes profondeurs de la couche d'eau mélangée de surface (épilimnion en été), des sous-échantillons issus d'un échantillon d'eau intégrée dans cette même couche d'eau, cela au cours d'un cycle de quelques heures. Elle permettra de tester l'effet des UV en fonction du degré de pénétration des UV-B et de l'effet du brassage vertical caractéristique de cette couche d'eau, bien qu'il soit connu que ce dernier influence la durée et la dose du rayonnement subit par les organismes. A ce jour, il n'existe encore que très peu d'études qui ont pris en compte l'influence du brassage vertical et qui influence donc la durée et la dose du rayonnement subit par les organismes. Le brassage peut accroître l'effet négatif des UV quand les réponses biologiques dépendent d'une exposition cumulée (photo-inhibition, photobleaching, mortalité cellulaire). Inversement, si les capacités de dommage et de réparation induites par la lumière sont en équilibre, le brassage n'a potentiellement qu'un effet limité. Idéalement et pour simuler le mélange vertical naturel, les échantillons pourront être portés par un appareil spécialement conçu dans ce but, montant et descendant automatiquement dans la colonne d'eau (Bertoni et al. 2005). Ce type d'appareil existe et une collaboration de travail est d'ores et déjà en marche avec nos collègues italiens pour le 'design' d'un nouvel appareil adapté à nos bouteilles de grand volume.

Les paramètres suivis seront les concentrations en éléments nutritifs, en carbone organique dissous et particulaire, les abondances cellulaires des différents compartiments biologiques suivants (bactéries auto- et hétérotrophes, phytoplancton, flagellés et ciliés mixo- et hétérotrophes) et l'abondance et l'activité virales. Les mesures d'activité bactérienne seront effectuées à l'aide de fluorochromes permettant d'accéder à la viabilité/activité bactérienne. Cette mesure sera critique d'autant qu'il est possible que le suivi de modification de biomasse ne révèle que peu de variations. La diversité bactérienne sera également appréhendée soit par la méthode FISH, soit par DGGE (et t-RFLP avec l'accueil d'un post-doctorant italien spécialiste de cette technique). Des mesures de lumière sont essentielles à ces expérimentations, étant donné notre plan d'incubation à différentes profondeurs. Nous prendrons donc en compte ce paramètre, grâce à l'acquisition récente d'un photo-irradiance-mètre. Ces mesures seront complétées au moyen des mesures d'une sonde radiomètrique UV à l'intérieur des enceintes d'incubation.

Les instruments utilisés seront la cytomètrie en flux, la microscopie électronique, la microscopie à épifluorescence, et les outils de la biologie moléculaire (techniques de « fingerprinting ») pour suivre les changements induits dans la diversité microbienne (bactéries et éventuellement eucaryotes) à l'échelle de quelques jours. La microscopie électronique permettra aussi d'intégrer un paramètre extrêmement intéressant : l'importance relative des bactéries lysogènes qui, pour les virus, représente une stratégie de maintien dans des conditions environnementales contraignantes (et donc un traceur biologique de l'impact des UV).

Les questions fondamentales auxquelles ces expériences permettront de répondre sont les suivantes:

- Quel est l'impact du rayonnement UV sur la dynamique, la diversité et l'activité des communautés microbiennes du lac du Bourget ?
- Quelles sont les conséquences en terme d'interactions entre espèces et notamment au niveau du transfert de matière et d'énergie le long de la chaîne trophique pélagique ?

Initiateur et porteur de ce projet dans les moindres détails, j'en suis aujourd'hui à m'occuper des documents et réunions préparatoires pour/avec l'ensemble des protagonistes impliqués directement et indirectement dans ce projet afin de poser les idées à plat, discuter du calendrier, du matériel, de la disponibilité, des paramètres à mesurer, etc…

III.2. Les suites à donner au premier congrès européen portant sur l'écologie des phages aquatiques

J'ai initié et organisé le premier congrès européen portant sur l'écologie des virus bactériophages dans les milieux aquatiques (EWAPE-1). Il a eu lieu du 2 au 4 février 2005 à Thonon-les-Bains (Haute-Savoie) dans le cadre somptueux du Château de Ripaille. Pendant 3 jours, les meilleurs spécialistes européens et un expert international invité venant de Los Angeles (14 nationalités représentées) ont confronté leurs résultats, discuté et fait des propositions concrètes afin de structurer un vrai réseau de recherche sur cette thématique. Ce réseau aura pour objectif de mettre en place des projets/programmes communs, organiser des ateliers de travail théoriques et pratiques, faciliter les transferts de technologie, favoriser les échanges d'informations entre chercheurs, mais aussi les voyages et les contrats pour les étudiants doctorants et/ou post-doctorants.

Pendant ces 3 jours, les participants ont pu entendre 25 communications orales et lire 18 posters portant sur la dynamique et la diversité des bactéries et des virus en milieu aquatique, le rôle de ces microorganismes dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques dulçaquicoles ou marins, les méthodes et techniques employées pour compter ou évaluer l'activité de ces microorganismes, les flux de gène et leur conséquence sur l'évolution des communautés microbiennes, etc. De l'avis de toutes et tous, le colloque a été un énorme succès tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Cette première devrait être suivie par un congrès du même type tous les 2 ou 3 ans dans un des pays membres de l'Union européenne. Cette proposition a d'ailleurs été discutée à Amsterdam au mois d'avril.

Cet événement exceptionnel, qui a nécessité plusieurs mois de travail pour son organisation (contacts, écriture des projets, recherches de ressources financières et matérielles, logistique locale, rencontre avec les partenaires financiers, préparation des lieux, création d'un site INTERNET, l'animation, l'accueil, …) a été financé à hauteur de 25 000 Euros, par l'Europe (*European Science Fundation**, 14 000 Euros), l'Université de Savoie (3 000 Euros), l'INRA (3 000 Euros dont 1 500 du département EFPA), le conseil général de Haute-Savoie (1 500 Euros), le conseil régional de Rhône-Alpes (1 000 Euros), *Véolia Environnement* (1 000 Euros) et la ville de Thonon-les-Bains (1 500 Euros équivalent).

De nombreuses informations (contexte, liste des participants et leurs adresses, présentations en ligne des congressistes, partenaires financiers et matériels, actes du colloque avec résumés des présentations, galerie de photos, etc) sont disponibles sur un site INTERNET dédié à l'événement et aux actualités en cours à l'adresse suivante : http://www.thonon.inra.fr/EWAPE1/index.htm (**Figure 16**).

Un des premiers résultats concrets post-congrès a été la mise en place d'un réseau national portant sur l'écologie des virus des microorganismes aquatiques. Cela concerne les grandes EPST

(INRA, CNRS, IRD, Universités) et au minimum 6 équipes de recherche sur le territoire français (basées à Thonon, Montpellier, Villefranche-sur-mer, Banyuls-sur-mer, la Rochelle et Clermont-Ferrand) et une au Sénégal (Dakar). La participation au congrès sur les virus de microalgues m'a permis de découvrir d'autres partenaires potentiels, à savoir une équipe à Marseille et une équipe à Paris. J'ai invité ces personnes à participer à notre réunion.

Parmi les autres résultats et retombées du workshop, on peut mentionner que la revue *Aquatic Microbial Ecology* a demandé l'édition d'un numéro spécial portant sur l'écologie des phages en milieu aquatique et que ce volume sera préfacé par le Dr Fereidoun RASSOUZALDEGAN, éditeur en chef de la revue, qui fera référence à EWAPE-1.

** sur 308 demandes déposées en 2004, seulement 60 projets dont celui-ci ont été financés*

La boucle microbienne du lac du Bourget va donc devenir une référence à l'échelon national et international. C'est la raison pour laquelle j'ai évoqué ici l'existence de ce colloque et de ces retombées immédiates et à venir. Typiquement, ce colloque a donnée l'idée d'organiser d'autres colloques (voir chapitre suivant).

Figure 16 : Le site Internet dédié à EWAPE-1 (langage PhP dynamique) que j'ai conçu et fait réaliser par un étudiant

III.3. Un congrès autour du lac du Bourget en 2006 ?

En préparant cette HDR, j'ai donc essayé de faire une revue de la littérature portant sur le lac du Bourget. Je me suis rapidement rendu compte de la pénurie de certains travaux (les nôtres typiquement !) mais aussi une richesse passée et/ou présente dans bien d'autres domaines (la planctonologie classique, la paléolimnologie, l'archéologie) et les nombreux projets en cours (typiquement avec le projet grand lac comme le pacage piscicole, la réintroduction d'animaux, la protection et la réimplantation des herbiers, etc). L'idée est alors venue tout naturellement d'organiser en 2006 un colloque « autour du lac du Bourget » réunissant scientifiques de tous horizons, utilisateurs/connaisseurs (pêcheurs, plongeurs, etc) du lac sans oublier les gestionnaires, convaincu par le fait que nous avons tous à apprendre des uns et des autres. Un comité scientifique organisationnel sera bientôt formé et une première liste de diffusion est d'ores et déjà créée. A la date du 1er avril, j'ai contacté environ 50 personnes et les premiers retours ont été extrêmement encourageants. Ce projet sera coordonné par Isabelle DOMAIZON, Jérôme POULENARD et moi-même. Il est fort possible que l'idée soit étendue à l'ensemble des grands lacs péri-alpins.

III.4. Deux nouvelles thèses ?

III.4.1. Dynamique et diversité phytoplanctonique de deux lacs-réservoir du bassin de la Seine

Une étudiante, présente depuis 2004 dans notre équipe, est un jour venu me voir en me demandant de l'aider à trouver un sujet de thèse et un financement. Il s'agit d'Anne ROLLAND qui travaillait dans notre équipe avec Jean-Claude DRUART sur la diversité phytoplanctonique depuis quelques temps déjà. Face à sa motivation et l'excellence de cette candidate, un énorme effort a été fait pour relever ce « challenge ». La recherche de partenaires a donc été entamée et une demande de bourse CIFFRE avec le GREBE (Société d'Etude et de Conseil eau-sol-environnement Lyonnais : http://perso.club-internet.fr/grebe) et l'IIBRBS (L'Institution Interdépartementale des Barrages-Réservoirs du Bassin de la Seine : http://www.iibrbs.fr/plus/plus.htm) a donc été déposée mi-avril pour travailler sur la dynamique, la diversité et les moyens de contrôle possibles des efflorescences phytoplanctoniques de deux lacs-réservoirs du bassin versant de la Seine. Un effort a été fait pour contenter l'ensemble des parties prenantes et je me suis particulièrement attaché à ce qu'il s'agisse d'un vrai sujet de thèse et pas d'une prestation de service. Ce sujet de thèse portera donc sur les différents facteurs contrôlant la communauté phytoplanctonique en terme de biomasse et de structure ainsi que leur impact et leur importance relative afin de mieux comprendre la dynamique de ces populations et, en dernier lieu, d'en assurer si possible le contrôle avant toute prolifération excessive, question actuellement au cœur des préoccupations des gestionnaires et des acteurs de la surveillance. Ainsi, nous avons proposé de travailler sur un ou deux lacs-réservoirs du

bassin versant de la Seine qui sont des milieux d'eau douce gérés par l'Institut Interdépartemental des Barrages-Réservoirs du Bassin versant de la Seine (IIBRBS). L'objectif de ce travail sera de décrire dans le temps et dans l'espace la dynamique et la diversité des organismes phytoplanctoniques susceptibles de proliférer au sein de ces écosystèmes. *In fine*, cette étude pourra proposer des solutions de contrôle des efflorescences au moyen de traitements physiques et/ou chimiques et/ou biologiques et tentera de répondre à un des objectifs majeurs de la nouvelle Directive Cadre Européenne (DCE) sur l'eau : « Atteindre un 'bon état' des milieux aquatiques permettant la plus large panoplie d'usages : eau potable, usages économiques, loisirs, …». Nous tenterons également i) de modéliser les efflorescences phytoplanctoniques dans ces deux lacs-réservoirs à partir des informations obtenus pendant 3 ans de suivi, ii) de proposer l'outil comme un instrument de prédiction utile à la compréhension de la dynamique des blooms algaux. Pour cela, nous utiliserons le logiciel STELLA.

Les questions auxquelles nous tenterons de répondre sont donc les suivantes :

- Quelle est la dynamique temporelle et spatiale des efflorescences phytoplanctoniques sur le ou les plans d'eau sélectionnés ?
- Quels sont les facteurs physiques, chimiques et biologiques qui interviennent dans la mise en place, le maintien et le déclin de ces efflorescences ?
- Des moyens de contrôle peuvent-ils être proposés pour lutter contre ces efflorescences ?
- La modélisation est-elle un élément de réponse et un outil utile à la compréhension et la gestion de la dynamique de ces efflorescences ?

Une partie du travail expérimental au laboratoire consistera à calibrer la sonde spectrofluorimétrique à l'aide de souches pures isolées à partir d'échantillons naturels provenant des lacs que nous étudierons. Les tests de calibration seront réalisées sur des cultures d'environ 30 jours afin d'obtenir une fluorescence maximale de leur part (Beutler et al. 2004). La calibration de cet appareil de mesure sera une étape clef pour son bon fonctionnement ce qui sous-entend un travail long et minutieux. La seconde partie du temps allouée au laboratoire concernera le dénombrement. Pour le phytoplancton nous utiliserons un microscope inversé Axiovert 135 (Zeiss) et les comptages se feront sous la supervision de Jean Claude Druart à l'INRA. Le zooplancton sera compté sur un microscope droit Olympus BX40 et seront réalisés par la thésarde avec l'aide de Leslie Laine, technicienne spécialiste du zooplancton d'eau douce à l'INRA. Enfin, le dénombrement des bactéries et des virus se fera par cytométrie en flux, technique très bien développée et mise au point par moi-même à la Station d'Hydrobiologie Lacustre de l'INRA de Thonon-les-Bains. La troisième partie enfin concernera le traitement statistique des données, l'exploitation des données, les essais de modélisation, la rédaction, etc

Les résultats de cette thèse nous intéresseront dans le cadre du suivi de la qualité des eaux du lac du Bourget notamment au niveau de l'optimisation de l'utilisation de la sonde. C'est la raison pour laquelle je me suis permis de mentionner ce travail à venir dans ce dossier. La calibration de cette sonde sur les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget est d'ailleurs en cours dans le cadre du MASTER 2 de Bérengère LITTOT.

Littot, B. **2005**. Calibration et validation des signatures de fluorescence algale de la sonde bbe Fluoroprobe. Rapport de MASTER 2 (en cours, encadrement : **S. Jacquet**)

III.4.2. Dynamique et diversité du pico- et nanophytoplancton lacustre

Ce travail est celui proposé à Maria CELLAMARE et déjà explicité plus haut. J'en profite pour dire ici que j'avais déposé ce sujet au département EFPA de l'INRA et qu'il a été classé parmi les 8 projets post-doctoraux retenus en 2005. A la date de rendre ce rapport, je ne sais pas s'il sera financé.

III.5. Un nouveau projet sur les virus de microalgues

On sait aujourd'hui que les virus jouent un rôle clef dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. L'écologie virale étant une science jeune, très peu d'études existent et cette lacune d'informations sur un compartiment biologique pourtant clef est particulièrement marquée dans les écosystèmes lacustres. De plus, la plupart des études se sont surtout intéressés aux virus bactériophages et cyanophages et très peu d'attention a été porté aux virus de microalgues eucaryotiques. A notre connaissance, aucun travail n'a encore été rapporté sur les écosystèmes français lacustres ! A la fin mai, je déposerai un dossier sur cette thématique de recherche en réponse à l'appel à propositions de recherche dans le domaine de la biodiversité (APR IFB-ANR 2005). J'ai demandé à Télesphore SIME-NGANDO d'être un partenaire privilégié. Il sera question :

- de caractériser et évaluer la biodiversité virale de microalgues pour un certain nombre de lacs français ayant des situations trophiques différentes (Annecy, Bourget, Léman, Pavin, Sep, Aydat) ;
- de comprendre les évolutions de cette diversité et de la focntion de ecs virus dans le contrôle de la diversité planctonique

Ma volonté est de recruter un chercheur postdoctoral qui travaillera sur cette thématique et d'acquérir les matériels encore non disponibles dans notre équipe. Les outils utilisés seront la PFGE, la DGGE, la cytométrie en flux, les techniques d'isolement et de purification. Un sujet de MASTER2 a d'ores et déjà été déposé dans plusieurs écoles doctorales.

IV. Synthèse des productions utilisées dans ce rapport depuis mon recrutement (fin 2001)

Le résumé de chaque article cité est donné ci-après dans l'ordre présenté ci-dessous.

2002

Leboulanger, C., U. Dorigo, **S. Jacquet**, B. LeBerre, G. Paolini and J.-F. Humbert. **2002**. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology 30:83-89*

2003

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2003**. Dynamics and diversity of heterotrophic bacteria in Annecy, Bourget and Geneva lakes. *1st FEMS Symposium, Ljubljana, Slovenia, June 2003*

2004

Jacquet, S., B. Leberre, G. Paolini and J.-F. Humbert. **2004**. Variations in the spatial distribution of Planktothrix rubescens in lac du Bourget (France). *6th International Congress on Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway, June 2004*

Domaizon, I., U. Dorigo, S. Personnic, J. Comte, A. Mbade Sene, A. Millery, D. Fontvieille and **S. Jacquet**. **2004**. Assessment of protozoan predation impact on aquatic bacteria: in situ experimental approaches. *Workshop on microbial loop, Pallanza, Italy, October 2004*

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2004**. Cyanophage diversity, inferred from g20 sequence analyses, in the largest French lake in France, Lake Bourget. *Applied and Environmental Microbiology 70:1017-1022*

2005, sous presse et acceptée

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maisonnette, B. Leberre and J.-F. Humbert. **2005**. Variations in the microcystins production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed by a four years in situ survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. *Microbial Ecology (sous presse)*

Comte, J., **S. Jacquet**, S. Viboud, D. Fontvieille, G. Paolini and I. Domaizon. **2005**. Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, Savoie, February to July 2002). *Microbial Ecology (sous presse)*

Duhamel, S., I. Domaizon, S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Assessing the microbial community dynamics and the role of viruses as bacterial mortality agents in Lake Geneva. *La Revue des Sciences de l'eau (en révision)*

Jacquet, S., J.-F. Briand, C. Leboulanger, C. Avois-Jacquet, G. Paolini, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, J.-C. Druart, O. Anneville and J.-F. Humbert. **2005**. The proliferation of the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae 4: 651-672*

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, S. Duhamel, A. S. Pradeep Ram, M. Heldal and T. Sime-Ngando. **2005**. Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshwater Biology 50: 627-645*

Jacquet, S. and S. Duhamel. **2005**. Flow cytometric analysis of bacteria and viruses in lake sediments. *4th Algal Virus Workshop, Amsterdam, The Netherlands, April 2005*

En révision et soumis

Oberhaus, L. J.-F. Briand, C. Leboulanger, **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2005**. Comparative effects of light quantity and quality on growth of the two cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *Journal of Phycology (soumis)*

Dorigo, U., S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Routine quantification of freshwater microbial communities using flow cytometry and epifluorescence microscopy: case studies in French alpine lakes. *Systematic and Applied Microbiology (en révision)*

Duhamel, S. and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analysis of bacteria and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods (en révision)*

En fin de préparation

Jacquet, S., S. Personnic, I. Domaizon, T. Sime-Ngnado. **2005**. Counting aquatic bacteria and viruses: are methods comparable?

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, U. Dorigo and T. Sime-Ngnado. **2005**. Grazing influences virus-induced bacterial mortality within short-time scales.

Jacquet, S., T. Sime-Ngando, U. Dorigo, A. Millard, B. Leberre, J. Lepault and B. Delmas. **2005**. A new virus infecting PE-rich freshwater picocyanobacteria.

Personnic, S., U. Dorigo, B. Leberre and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analyses of microbial communities (viruses, bacteria and small phytoplankton) on Lakes Annecy, Bourget and Geneva, France.

Sime-Ngando, T., I. Domaizon, S. Personnic and **S. Jacquet. 2005**. Diel patterns of microbial community structure and viral functioning in Lake Bourget.

L'ensemble des publications de l'auteur a été spécifié dans le dossier d'inscription.
Toutes ces publications peuvent être obtenues à l'adresse suivante :
http://jacquet.stephan.free.fr/publications.htm

Leboulanger, C., U. Dorigo, **S. Jacquet**, B. LeBerre, G. Paolini and J.-F. Humbert. **2002**. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol. 30:83-89*

A recently available submersible fluorescent probe was configured and used to survey the vertical distribution of the deep-living toxic and filamentous cyanobacterium *Planktothrix (Oscil-latoria) rubescens* among the autochthonous algal communities in Lake Bourget, France. This *in situ* measuring spectrofluorometer, which can be used to perform chlorophyll analysis and integrated algal class determination, provides a realistic estimation of the abundance and dynamics of the cyanobacterial population that is known to produce the hepatotoxic heptapeptides microcystin RR and LR. Data provided from in-line measurements using the probe and from *P. rubescens* cell counts obtained by discrete sampling were closely correlated ($r = 0.899$, $p < 0.01$), as were in-line data and spectrophotometric total chlorophyll *a* measurements ($r = 0.775$, $p < 0.01$). A survey conducted from December 1999 to May 2001 revealed that *P. rubescens* exhibits a deep maximum level (typically between 10 and 15 m) in spring and summer (reaching concentrations of up to 20 µg equivalent chl *a* l^{-1} , i.e. 27 000 cells ml^{-1}), whereas it spreads from the surface either to the top of the thermocline or to the bottom of the lake, in autumn and winter respectively. We propose that the probe could be used as a powerful tool for assaying the occurrence and dynamics of microalgal blooms, typically toxic cyanobacteria that call for accurate and rapid monitoring to assess the health of the ecosystem and to alert the authorities about potential risks regarding pumping and use of the lake water for drinking-water production purposes.

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2003**. Dynamics and diversity of heterotrophic bacteria in Annecy, Bourget and Geneva lakes. *1st FEMS Symposium, Ljubljana, Slovenia, June 2003.*

A comparative study of the dynamics and diversity of heterotrophic bacterioplankton of three Alpine lakes in France was undertaken. These lakes are characterised by different nutrient loads and in particularly by the presence (lake Geneva and lake Bourget) or absence (lake of Annecy) of toxic proliferations of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. Each lake was sampled at least once a month and at different water depths in order to establish relationships between toxic proliferations and changes in the bacterioplankton community, which may be responsible of the lysis of the cyanobacterial cells and toxins degradation. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and sequencing of 16S rDNA were performed to examine the bacterioplankton community composition and to observe changes in the numerically dominating populations. The DGGE-patterns were analysed in relation to lake characteristics, season and dynamics of *Planktothrix rubescens*. The phylogenetic affiliation of the predominant members of the microbial communities (*Proteobacteria*, *Cytophage-Flavobacterium-bacteroides*) was also inferred by Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH). Flow cytometry was used to establish the total number of heterotrophic bacteria and to discriminate major populations. First results indicate that the diversity and dynamics of the bacterioplankton vary in relation to the lake and the period of study.

Jacquet, S., B. Leberre, G. Paolini and J.-F. Humbert. Variations in the spatial distribution of *Planktothrix rubescens* in lac du Bourget (France). 6th International Congress on Toxic Cyanobacteria, Bergen, Norway, June **2004**

Lac du Bourget located in the Alps, is the largest natural French lake. Despite a strong decrease of phosphorus concentration during the last 20 years, proliferations of the toxic filamentous cyanobacterium *Planktothrix rubescens* regularly occurred since 1996 (Humbert *et al.,* 2001;

Jacquet *et al.* 2004; Briand *et al*., submitted). In the global framework of our studies dealing with the ecology of *P. rubescens*, we interested in the spatial (both horizontal and vertical) distribution of the cyanobacterium and asked the following question: What is the heterogeneity in the vertical and the horizontal distributions of this cyanobacterium in this great sub-alpine lake (Lac du Bourget) during an annual cycle ? This study showed that due to hydrodynamical processes, the vertical and the horizontal distributions of the *P. rubescens* biomass can vary largely throughout Lac du Bourget. From a practical point of view, its appears that the use of an unique sampling station in the framework of the monitoring of this cyanobacterium was not able to track this important variability recorded in the distribution of *P. rubescens* biomass. This may have important consequences for the management of the water abstraction especially when the offtake structure does not have the provision for multiple offtake depths.

Domaizon, I., U. Dorigo, S. Personnic, J. Comte, A. Mbade Sene, A. Millery, D. Fontvieille and **S. Jacquet**. **2004**. Assessment of protozoan predation impact on aquatic bacteria: in situ experimental approaches. Pallanza, Italy, October 2004

Two methods were used simultaneously to assess the impact of protozoan predation on heterotrophic bacteria of the largest natural French Lake (the mesotrophic Lake Bourget). A size-fractionation approach based on the fractionation into 6 size groups (<0.8µm, <2µm, <5µm, <20µm, <200µm, no filtration) allowed us to estimate the importance of predation as a limiting factor for net growth rates of bacteria, flagellates and ciliate groups. The ingestion of fluorescent labelled particles allowed us to determine taxon-specific ingestion rates of ciliates and flagellates (heterotrophs and potentially mixotrophs). The experiments were conducted three times from early spring to the end of summer (April, May, and August 2003) from an integrated water column sample between 0 and 10 m depth taken in the middle of the lake. The size fractionation method allowed us to obtain a conceptual scheme dealing with the main trophic links of the pelagic microbial food web. Impacts of the various size classes of predators on the structure and diversity of bacterial communities were also monitored from bacterial size variations, FISH and DGGE techniques). The method using fluorescent particles gave some additional information on the relative importance of each protozoan taxon in the predation pressure (% of bacterial production grazed by the different taxa). Results on protozoan grazing rates obtained by these 2 methods are compared, and the potential shortcomings and complementarities of the 2 experimental approaches are discussed.

Dorigo, U., **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2004**. Cyanophage diversity, inferred from g20 sequence analyses, in the largest French lake in France, Lake Bourget. *Appl. Environ. Microbiol. 70:1017-1022*

The genetic diversity of the natural freshwater community of cyanophages and its variations over time have been investigated for the first time in the surface waters of the largest natural French lake. This was done by random screening of clone libraries for the g20 gene and by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Nucleotide sequence analysis revealed 35 distinct cyanomyovirus g20 genotypes among the 47 sequences analyzed. Phylogenetic analyses showed that these sequences fell into 7 genetically distinct Operational Taxonomic Units (OTUs). The distances between these OTUs were comparable to those reported between marine clusters. Moreover, some of these freshwater cyanophage sequences were genetically more closely related to marine cyanophage sequences than to other freshwater sequences. Both approaches on the g20 gene (sequencing and DGGE analysis) showed that there was a clear seasonal pattern of variation in the composition of

the cyanophage community that could reflect changes in its biological, chemical and/or physical environment.

Briand, J.-F., **S. Jacquet**, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maisonnette, B. Leberre and J.-F. Humbert. **2005**. Variations in the microcystins production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed by a four years in situ survey of Lac du Bourget (France) and by laboratory experiments. *Microb. Ecol. (sous presse)*

Between 1999 and 2002, a routine survey of water quality in the Lac du Bourget was performed in order to study the dynamics and toxin production of *Planktothrix rubescens*. Using liquid chromatography coupled to diode array detection and mass spectrometry, we found that two main variants ([D-Asp^3] and [D-Asp^3, Dhb^7] microcystins-RR) were produced. The proportion of these two variants was not influenced by the depth or the period of sampling. Expressed in microcystin-LR equivalents, high microcystins concentrations were recorded from August to December each year, reaching values of up to 6.7 µg.L^{-1}. A significant correlation was found between the microcystin cell content and the cell densities of *P. rubescens*. Cellular quotas of microcystins ranged between 0.1 and 0.3 pg.cell^{-1}. Simultaneously, laboratory experiments were performed on a strain of *P. rubescens* isolated from the lake, in order to assess the potential impact of various P-PO_4^{3-} concentrations on intra- and extra-cellular toxin production. Unlike natural populations, this strain only produced [D-Asp^3] MC-RR. The intracellular microcystin content was similarly correlated to the cell density, but the cellular quota was slightly higher (0.3 to 0.7 pg.cell^{-1}) than in the natural population. Again, as in the natural population, a linear relationship was found between growth rate and microcystin production rate. These findings support the possibility that environmental factors, such as phosphate concentrations, have no direct impact on toxin production by *P. rubescens*, but act indirectly by affecting growth rate.

Comte, J., **S. Jacquet**, S. Viboud, D. Fontvieille, G. Paolini and I. Domaizon. **2005**. Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, Savoie, February to July 2002). *Microb. Ecol. (sous presse)*

We investigated the dynamics and diversity of heterotrophic bacteria, auto- 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 (< 2 µm), but filaments, commonly considered to be grazing-resistant forms under increased nanoflagellates grazing, were also detected. These elongated cells mainly belonged to the *Cytophaga-Flavobacterium* cluster (CF), and were most abundant during spring and early summer, when mixotrophic or heterotrophic flagellates were the main bacterial predators. The CF group strongly dominated FISH-detected cells from March to June, whereas clear changes were observed in early summer when Beta- and Alpha - proteobacteria increased concomitantly with maximal protists 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 using an experimental approach based on fluorescent microbeads to assess the potential grazing impact of all protist taxa in the epilimnion. From the all 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 (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 (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 (HNF, 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 (3).

Jacquet, S., J.-F. Briand, C. Leboulanger, C. Avois-Jacquet, G. Paolini, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, J.-C. Druart, O. Anneville and J.-F. Humbert. **2005**. The proliferation of the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae 4: 651-672*

Lac du Bourget, in the Alps, is the largest natural French lake. Following major restoration programmes during the 1970s and early 1980s, involving massive efforts to reduce nutrient loads and pollution in the lake, the water quality has improved over the past two decades. This can be inferred from the increase in the nitrate:phosphate ratio, the intensification of the "clear-water phase" (i.e. the increase in the water column transparency in spring), and the reduction in the total phosphorus and chlorophyll *a* concentrations. However, blooms of the filamentous, phycoerythrin-rich, non-nitrogen fixing and hepatotoxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* have occurred since 1996 and have been maintained subsequently, at least during summer and autumn periods. Nutrients (especially phosphorus) are usually thought to be one of the most important factors responsible for cyanobacterial blooms, and so the question is asked if this bloom is a paradoxical outcome of the restoration programs? Using a large set of data taken from surveys of Lac du Bourget, from the literature, and from recent laboratory experiments, and also using field data for the neighboring Lake Geneva, we propose a realistic scenario to account for the population dynamics of the cyanobacterium and the occurrence and maintenance of the bloom in Lac du Bourget. The characteristics of the lake (high water column stability, deepening of the nutrient-depleted layer during the last decade, a long water residence time), local conditions (the nutrient load and charge) and global changes (global warming) all had to be taken into account to explain this bloom. We suggest that the success of *P. rubescens* in Lac du Bourget is probably due to increased transparency and a longer stratified period following 1) the restriction of other phytoplankton species following reduced phosphorus, which has allowed *P. rubescens* to make use of organic phosphorus to improve its competitiveness; 2) warmer than average winter/spring periods allowing an earlier water stratification and *in fine* a competitive advantage to *P. rubescens,* 3) lower than average surface irradiance, which has also given the low-light preferring *P. rubescens* an advantage. Finally, this study highlights the importance of long-term data sets in attempting to elucidate the global causes of a major ecological problem (such as this cyanobacterial bloom) and impacts with regard to the function and use of freshwater ecosystems.

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

In addition to the study of microbial populations' dynamics in Lake Bourget (France), we performed three one-week *in situ* experiments in March-April (Exp1), May (Exp2) and August (Exp3) 2003 in order to assess protozoan and virus-induced mortality of heterotrophic bacteria.

Viral and bacterial abundances were obtained using flow cytometry (FCM) while protozoa were counted using epifluorescence microscopy (EFM). A dilution approach applied to pre-treated grazer free samples allowed us to estimate that virus lysis could be responsible for up to 60% (Exp1), 35% (Exp2) and 52% (Exp3) of daily heterotrophic bacterial mortality. Flagellate (both mixotrophic and heterotrophic) grazing in untreated samples, was responsible for 56% (Exp1), 63% (Exp2) and 18% (Exp3) of daily heterotrophic bacteria removal. Thus, according to our results, both viral lysis and flagellate grazing had a strong impact on bacterial mortality and this impact changed significantly with the period of the year. From parallel transmission electron microscopy (TEM) analysis, we found that the burst size ranged from 9 to 25 (Exp1), 10 to 35 (Exp2) and 8 to 25 (Exp3), the percentage of infected heterotrophic bacteria was 5.7% (Exp1), 3.4% (Exp2) and 5.7% (Exp3) so that the calculated percentage of virus-induced bacterial mortality was 6.3% (Exp1), 3.7% (Exp2) and 6.3% (Exp3). Although the same trend was recorded for results obtained with the dilution-FCM and TEM methods (r^2=0.9) in terms of viral impact, it clearly appears that the two methods yielded different results.

Jacquet, S. and S. Duhamel. **2005**. Flow cytometric analysis of bacteria and viruses in lake sediments. *4th Algal Virus Workshop, Amsterdam, The Netherlands, April 2005*

Flow cytometry (FCM) was successfully used to analyse freshwater bacteria and viruses in lake sediments after sample treatment and optimization of dilution/fixation/staining procedures. Biological particles from Lakes Geneva and Bourget were first separated from the sediments by using both pyrophosphate (0.01 M final concentration) and TWEEN 80 (10% final concentration) and sonification during 10 min in a bath filled with both water and ice. The best results (highest virus and bacterial yields from the bulk of the sediments) were obtained with formaldehyde fixation within a few hours (2% final concentration, vs. non fixation or use of glutaraldehyde), SYBR-Green II staining (x 1/20,000 stock solution concentration, vs. use of SYBR-Gold, SYBR-Green 1 and SYTO 9 dyes at different concentrations), and no use of DNAse 1. There was an important loss of particles after only a few days of preservation at 4°C or -22°C. For FCM analysis, samples were diluted in Tris-EDTA buffer (pH 8) and heated for 10 min at 80°C. Counts of bacteria and viruses were correlated with those obtained with epifluorescence microscopy but EFM gave always lower concentrations than FCM. The analysis of the distribution of the viruses in the water column and in the sediments of Lakes Bourget and Geneva revealed an important gradient with higher quantities in the sediment in the top layer than in the overlying waters of deeper in the sediment. It is likely that such a use of FCM could be applied for the detection of algal viruses in sediments

Oberhaus, L. J.-F. Briand, C. Leboulanger, **S. Jacquet** and J.-F. Humbert. **2005**. Comparative effects of light quantity and quality on growth of the two cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *J. Phycology (soumis)*

The effects of light intensity and quality on the growth of the cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens* were assessed on closed batch cultures. The relative competitiveness of the geen-pigmented *P. agardhii* and the red-pigmented P. rubescens was evaluated in separate and mixed cultures, under different light intensities and qualities, at two different temperature chosen as representative of the natural conditions favouring the blooming of each species, respectively. The two species could therefore could be considered as two ecotypes, that are adapted to different light and temperature environment, and competition experiment showed that the combination of light and temperature largely control the success of one strain compare to another.

Dorigo, U., S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Routine quantification of freshwater microbial communities using flow cytometry and epifluorescence microscopy: case studies in French alpine lakes. *J. Microb. Methods (en révision)*

Concerns about obtaining accurate determinations of the concentrations of viruses and bacteria in freshwater samples led us to examine a broad battery of counting and storage procedures for use in flow cytometry (FCM) and epifluorescence microscopy (EFM) analyses. Sample preparations were done so as to optimize counts and preservation by using different types and concentrations of aldehyde-based fixatives, stains belonging to the SYBR family, dilution media, temperature and storage conditions. Whenever possible, FCM and EFM counts were compared. Results obtained using FCM supported the addition of fixative for bacteria, preferably glutaraldehyde at a final concentration of 2%, dilution in 0.2-µm or 0.02-µm filtered Tris-EDTA buffer (TE, pH = 7.5), staining with SYBR Green I at a final concentration of 10^{-4} or and incubating at ambient temperature for at least 15 minutes. For viruses, there was no need to add fixative, whereas dilution in recently-autoclaved and 0.02-µm filtered TE and incubation with SYBR Gold at a final concentration of 2×10^{-5} at 75°C for 10 minutes is recommended. If possible, FCM samples should be counted on day = 0, although we do show that bacterioplankton samples, at least, may be stored at 4°C and counted at 24 h later but not beyond. The conditions required for optimum EFM counts of both bacteria and viruses involved were to staining filters with SYBR Gold at a final concentration of 10^{-3}. Slides could be counted for up to 1 month if rapidly frozen and stored at –20°C. Our results clearly demonstrate the importance of defining the best conditions in order to get reliable counts of microbial communities such as viruses and bacteria. Each research laboratory should undertake such tests according to the equipment available, and the needs and area of their research.

Duhamel, S., I. Domaizon, S. Personnic and **S. Jacquet**. **2005**. Assessing the microbial community dynamics and the role of viruses as bacterial mortality agents in Lake Geneva. *La Revue des Sciences de l'eau (en révision)*

The aims of this work have been to study for the very first time the succession of the microbial communities (from viruses to ciliates) in the largest occidental European lake (Lake Geneva) and to perform two one-week *in situ* experiments in March-April (Exp1) and May (Exp2) 2004 in order to assess both small flagellate protozoan and virus-induced mortality of heterotrophic bacteria. Nanoflagellates and viruses could be responsible for betwen 31 and 42% of the total daily mortality of heterotrophic bacteria. In May, viruses could explain up to 10% of the bacterial mortality whereas flagellates were responsible for 32% of the bacterioplankton removal.

Duhamel, S. and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analysis of bacteria and virus-like particles in lake sediments. *J. Microbiol. Methods (soumis)*

Flow cytometry (FCM) was successfully used to analyze freshwater bacteria and viruses in lake sediments after relatively simple sample treatment and optimization of dilution/fixation/staining procedures. Biological particles from Lakes Geneva and Bourget were first separated from the sediments by using both Sodium Pyrophosphate (0.01 M final concentration) and Polyoxyethylene-Sorbitan Monooleate (10% final concentration) and sonicating for 3 min in a water bath. The best results (based on FCM signature and the highest virus and bacterial yields from the sediments) were obtained by formaldehyde fixation carried out within a few hours (2% final concentration, vs. no fixation or using glutaraldehyde at different concentrations), SYBR-Green II staining (x 1/20,000

stock solution concentration, vs. use of SYBR-Gold and SYBR-Green I dyes at different concentrations). There was a considerable loss of particles after only a few days of storage at either 4°C or -22°C. For FCM analysis, the samples were diluted in Tris-EDTA buffer (pH 8) and heated for 10 min at 75°C after incubating for 5 min in the dark. The bacterial and viral counts paralleled those obtained using epifluorescence microscopy, but EFM always gave lower counts than FCM. Analysis of the distribution of the viruses in the water column and in the sediments of Lakes Bourget revealed a marked gradient, with larger quantities in the top layer of the sediment than in the water above it. These results are discussed, as well as the possible novel application of flow cytometry in the study of aquatic viral ecology.

Jacquet, S., S. Personnic, I. Domaizon, T. Sime-Ngnado. **2005**. Counting aquatic bacteria and viruses: are methods comparable? *En préparation*

A test to compare different counting methods of pelagic bacteria and viruses has been performed from Lake Bourget samples. 16 samples of different depths and time of the day during 48 h were taken in December 2004. Samples were fixed with formaldehyde on board and were then separated in different aliquots of equal volume. They were conserved at 4°C in exactly the same conditions before their analysis using 1 Flow cytometer (FCM), 1 transmission electron microscope (TEM) and 3 different epifluorescence microscopes (EFM). Analyses were performed by the same or different persons the same day. FCM always gave highest counts for both bacteria and viruses. When comparing minimum, maximum and average values given by the different techniques and manipulators, there was not an important difference between the results (< 20%), however, we only found a clear and positive correlation between FCM and one of the EFM counts for the bacterial community. These results clearly highlight differences between methods and outline the problem we face when we compare data between published data.

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, U. Dorigo and T. Sime-Ngnado. **2005**. Grazing influences virus-induced bacterial mortality within short-time scales. *En préparation*

We tested the importance of the presence of small grazers (both heterotrophic and mixotrophic flagellates) on the viral-induced bacterial mortality in Lake Bourget (France) at 3 different periods of the year (March, May and August 2003). Samples were filtered through <5, <2 and <1.2 µm filters in order to keep or eliminate the small predators. After only 24 h of incubation in dyalis bags maintained *in situ*, samples were taken for flow cytometry, epifluorescence and transmission electron microscopy analyses. We always observed that viral-induced mortality of the bacterioplankton was enhanced in the presence of the predators. Typically, the viral impact was multiplied by 8-9 fold at the end of March, 2-3 fold in May and 7-8 fold in August in the presence of very small predators (i.e. for the <2 and <5 µm treatments) by comparison with the <1.2 µm treatment. Our results corroborate previous ones pointing out the tight coupling existing between the different compartments of the aquatic microbial loop and more especially the synergy between grazing- and virus-induced mortality of bacteria. In addition, our results reveal that this coupling between the different communities operates at very short time scale.

Jacquet, S., T. Sime-Ngando, U. Dorigo, A. Millard, B. Leberre, J. Lepault and B. Delmas. **2005**. A new virus infecting PE-rich freshwater picocyanobacteria. *En préparation*

We recently assessed the genetic diversity of the natural freshwater community of cyanophages and its variations over time in surface waters of Lake Bourget (the largest natural French lake) by both random screening of clone libraries for the g20 gene (which codes for the portal vertex protein) and by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). We revealed an important diversity of the cyanomyovirus community (Dorigo et al. 2004). Since them, attempts were made to isolate one or several viruses infecting the dominant picocyanobacterial community in this lake and in the neighbouring Lake Annecy, *i.e.* the phycoerithryin (PE)-rich forms. Using two *Synechococcus* strains successfully isolated from Lake Annecy (TCC185 and TCC186), and after repeated infection experiments with natural waters enriched in viral particles and purification steps, we were able to isolate at least two different viruses. We will only focus on the main virus, referred to as SynVir1. The susceptibility of a variety of microalgal and cyanobacterial species to SynVir1 was tested revealing that this virus was species- and probably strain-specific. Interestingly, it also infected a variety of PE-rich marine species. Burst size was about 100 viruses/cell. Both electron microscopy observations of the virus and phage nucleic acid extraction, followed by cloning-sequencing of restricted fragments revealed a clear homology with T4-like bacteriophages (*Myoviridae* family), whereas on the contrary *Myoviridae*-specific primers targeting the g20 gene failed to identify this virus as belonging to this family.

Personnic, S., U. Dorigo, B. Leberre and **S. Jacquet**. **2005**. Flow cytometric analyses of microbial communities (viruses, bacteria and small phytoplankton) on Lakes Annecy, Bourget and Geneva, France. *En préparation*

Aucun résumé disponible à ce jour

Sime-Ngando, T., U. Dorigo, S. Personnic, I. Domaizon, P. Perney and **S. Jacquet**. **2005**. Diel patterns of microbial community structure and viral functioning in the largest natural French lake. *En préparation*

Aucun résumé disponible à ce jour

Impose ta chance, serre ton bonheur,
va vers ton risque…. A te regarder,
ils s'habitueront.

René Char