



UNIVERSITE DE SAVOIE

THESE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ECOSYSTEMES

Par

SEBASTIEN PERSONNIC

soutenance prévue le
4 octobre 2007

Dynamique des communautés microbiennes et impacts des virus sur les bactéries auto- et hétérotrophes en milieu lacustre

Devant le jury composé de :

M.	T. BOUVIER	Chargé de recherche, CNRS Montpellier	Examineur
M.	M. BOUVY	Directeur de recherche, IRD Montpellier	<u>Rapporteur</u>
Mme.	I. DOMAIZON	Maître de conférence, Univ. Savoie	Co-directrice de thèse
M.	D. FONTVIEILLE	Professeur, Univ. Savoie	Directeur de thèse
M.	S. JACQUET	Chargé de recherche, INRA Thonon	Co-directeur de thèse
Mme.	H. MONTANIE	Maître de conférence, Univ. La Rochelle	Examinatrice invitée
M.	T. SIME-NGANDO	Directeur de recherche, Univ. Clermont Ferrand	<u>Rapporteur</u>



REMERCIEMENTS

La Savoie, la Haute-Savoie, les lacs alpins, les portes du soleil, Morzine, Avoriaz, Abondance, la dent d'Oche, la dent du Chat, le Chablais, la Bise, le port d'Amphion, le petit appartement du 53 Grande Rue, l'internat de médecine de Grenoble, le comté et autres pâtes cuites de chez Bujon, les pique-niques du midi les fesses dans la neige ou au bord du lac... que de souvenirs... que d'images et de moments inoubliables...

Cependant, n'était ce pas un peu éloigné des préoccupations marines d'un étudiant en océanographie ? En effet, quel ne fut pas l'étonnement de ma future femme quand je lui ai annoncé que son commandant Cousteau (merci les potes pour le surnom, et non Isa je ne fais définitivement pas une thèse « poissons ») partait pour les montagnes alors que je lui promettais coquillages et crustacés, plages de sable fin et fonds sous marins....

Voilà quatre ans se sont écoulés, nous nous sommes mariés et vivons nos dernières semaines dans les Alpes.... et le temps de faire le bilan est arrivé avant de re-partir vers de nouvelles contrées. Comme vous pouvez l'imaginer et sûrement compris la vie à Thonon et à Chambéry a été plus que satisfaisante et c'est avec une grande nostalgie que nous quitterons les pays de Savoie. De plus, cette satisfaction décrite n'a pas été uniquement personnelle, puisqu'elle l'a également été d'un point de vue professionnel. C'est pourquoi j'ai souhaité commencer par citer et remercier (en essayant de n'oublier personne) toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, pour enfin remercier une grande partie des amis et familles responsables de mon bien être et de ma joie de vivre au quotidien.

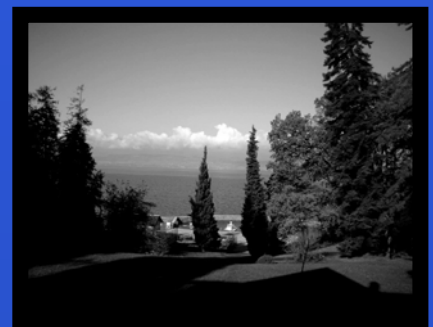


Tout d'abord je tiens à remercier Stephan Jacquet pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de microbiologie aquatique de Thonon les Bains, de m'avoir encadré durant ces quatre années de thèse et de sa disponibilité. Merci également à Isabelle Domaizon qui a rendu également ce travail possible et qui m'a permis de terminer sereinement ce travail à l'université de Chambéry et d'un point de vue personnel pour sa gentillesse et sa compréhension.

Je remercie également Dominique Fontvieille d'avoir obtenu cette bourse de thèse, me l'avoir accordé, d'en avoir pris la direction et de nous avoir laissé une entière liberté sur le sujet.

Mes remerciements vont à Jean Marcel Dorioz et Jean Guillard, directeur et directeur adjoint de la station d'hydrobiologie lacustre de Thonon les Bains, pour leur accueil au sein de la station, et de la même façon ma gratitude va à Agnès Bouchez et Jean François Humbert directrice et ancien directeur de l'équipe de microbiologie aquatique.

Un grand merci à l'ensemble du jury pour vos corrections, critiques et remarques, en espérant que cette rencontre autour de ce travail puisse faire naître de futures collaborations...





Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide directe de nombreuses personnes notamment Pascal Perney, Jean Christophe Hustache, Pascal Chifflet et Gérard Paolini avec qui j'ai passé de très bons moments lors de déplacements pour des prélèvements, de rangements intensifs du labo et de barbecues nocturnes. Mes remerciements vont à Mme Menthon, Brigitte Leberre, Annie Millery et Jean Noel Avriller pour leur assistance directe dans ce travail. Mes pensées vont à toutes les personnes de l'INRA de Thonon les Bains avec qui j'ai passé de très bons moments et c'est avec beaucoup de tristesse que mes pensées vont également à Micheline Rossi et Jean Pierre Bosse disparu trop tôt. J'ai également une pensée spéciale pour le cytomètre en flux qui m'a permis de réaliser plus de 10 000 analyses sans un

problème ! Je joins des remerciements à J. Colombet et T. Sime Ngando pour la collaboration au travail réalisé et une chaleureuse pensée à Telesphore pour son soutien à plusieurs reprises.

Il n'est pas possible de citer et d'avoir une pensée en quelques lignes pour toutes les personnes rencontrées à la station, du stagiaire de quelques mois à toutes les thésardes (et oui les thésards se font rares...). Je risquerais d'oublier des personnes importantes, alors il est vrai que je choisis la facilité mais je crois que toutes les amitiés que nous avons pu créer autour du « château » vont bien au delà... alors merci beaucoup... Je me souviendrai très longtemps de tous ces bons moments.



La vie à Thonon a également été très riche en « haut-savoyard local », du volley au wakeboard... la famille Sache, Antunes, Brousoz, mais également Jérôme, Isabelle, Christophe et Sonia, Fred, Julien... Merci à vous tous pour tous ces moments de loisirs et d'amitiés.

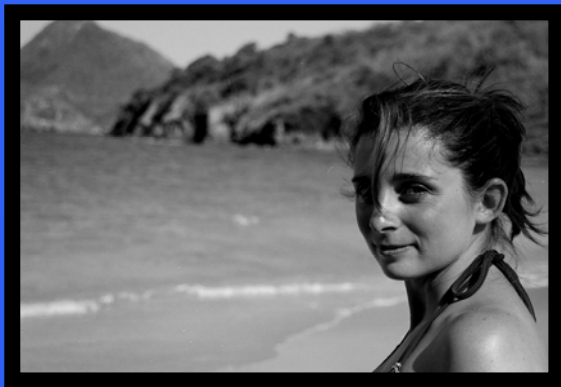
En parlant des amis, je ne peux m'empêcher de mentionner notre groupe d'amis « les poches », et ainsi leur écrire un petit mot amical, bien qu'ils ne comprennent toujours pas exactement sur quoi je travail, et les remercier pour tous ces bons moments, ces nombreuses fêtes... Je n'oublie évidemment pas le petit Brassart et Guillaume que je considère comme mon frère jumeau et mon grand frère respectivement. Je n'oublie pas mes amis du DEA, Eric et Enora, mes deux copains d'enfance Stéphane et Jean-Alexandre.

Je remercie tendrement toute ma belle famille, Annie, Hervé, Gwen, Fabien, Maëlys, Pierre-Yves et Marie-Flette pour tous les instants privilégiés passés ensemble et leur gentillesse qui laisse envisager un futur très agréable. Ces remerciements vont également à toute ma famille, grands parents, tantes, oncles, cousins...



Mes parents et ma petite sœur ont joué et continuent de jouer un rôle primordial dans ma vie. Tout d'abord mes parents qui me soutiennent et me guident depuis tout petit, et que je considère réellement comme un modèle. On n'a que très rarement l'opportunité d'écrire à ses parents combien ils ont compté et à quel point on les apprécie c'est pourquoi je me permets de le faire ici et j'en profite également pour les remercier profondément.

Ensuite ma petite sœur, qui a souvent jouer le rôle de « la grande » quand on était petits mais qui reste ma petite « zouzou » que je m'efforce de protéger et de rassurer. Je tiens à lui faire savoir que toute sa gentillesse, toutes ses autres qualités (et elles sont nombreuses...) et même si parfois elle fait passer son frère avant n'importe qui, tout ceci compte énormément pour moi.



Enfin je terminerai ces remerciements par la femme qui accompagne ma vie et qui lui donne ce goût si délicieux au quotidien, permettant de traverser n'importe quelle contrariété ou moment pénible sans encombres et d'amplifier tous les moments de joies en les partageant avec elle. Merci donc à Aurélie pour ce qu'elle est et ce qu'elle m'apporte... pour ce que nous avons vécu depuis 5 ans et ce que nous allons vivre dans les cent prochaines années... vous trouvez que ça fait beaucoup ? Pas moi !!!!

SOMMAIRE SIMPLIFIE

<i>Remerciements</i>	3
<i>Sommaire simplifié</i>	7
<i>Sommaire détaillé des chapitres</i>	9
<i>Liste des articles présentés dans cette thèse</i>	13
<i>Liste des figures et tableaux</i>	14
<i>Liste des abréviations</i>	18
CHAPITRE I : Contexte scientifique et objectifs	19
CHAPITRE II : Sites d'étude	49
CHAPITRE III : Approches et méthodologies	57
CHAPITRE IV : Dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy	107
CHAPITRE V : Impacts des virus sur les bactéries hétérotrophes et les picocyanobactéries appréhendés au moyen d'expériences	179
CHAPITRE VI : Conclusions perspectives	277
BIBLIOGRAPHIE	289
ANNEXES	313

SOMMAIRE DETAILLE DES CHAPITRES

CHAPITRE I : Contexte scientifique et objectifs	21
I.1 De la découverte des virus à l'écologie virale	21
I.1.a La fin du XIX ^{ième} siècle et la naissance de la virologie	21
I.1.b Du début du XX ^{ième} siècle jusqu'à la seconde guerre mondiale, F. D'Herrelle et les bactériophages	21
I.1.c La révolution virologique (1935-1965)	22
I.1.d L'avènement de la virologie médicale (1965 à nos jours)	23
I.1.e Les années 1990, et la naissance de l'écologie virale aquatique	24
I.2 Caractéristiques morphologiques, abondance et diversité des virus en milieu aquatique	25
I.2.a Taille des virus	25
I.2.b Abondance des virus	27
I.2.c Diversité virale	28
I.3 Origine des virus et rôle dans l'évolution des lignées cellulaires	33
I.4 Les différents cycles de vie des virus	34
I.4.a Le cycle lytique	35
I.4.b Le cycle lysogénique	36
I.4.c Le cycle chronique	37
I.5 Rôles fonctionnels des virus au sein des écosystèmes aquatiques	38
I.5.a Le réseau trophique aquatique, la boucle microbienne et les virus	38
I.5.b Les virus et les protistes hétérotrophes comme agents significatifs de la mortalité bactérienne	40
I.5.c Rôle des virus dans les processus du réseau trophique et les cycles biogéochimiques	41
I.5.d Le transfert (horizontal) de gènes et les interactions reliant virus et diversité des procaryotes	42
I.6 Objectifs et questions posées au cours de ce travail de thèse	46

CHAPITRE II : Sites d'étude	51
II.1 Présentation des sites d'étude	51
II.1.a Le (lac) Léman	51
II.1.b Le lac du Bourget	52
II.1.c Le lac d'Annecy	53
II.2 Intérêts des 3 sites d'étude	54
CHAPITRE III : Approches et méthodologies	59
III.1 L'approche écosystémique	59
III.2 L'approche expérimentale <i>in situ</i> : La méthode de dilution	60
III.2.a Principe de la méthode	61
III.2.b Description des expériences conduites	62
III.3. Autre approche expérimentale menée au Léman : La méthode de fractionnement et d'enrichissement en particules virales	64
III.3.a Principe et objectifs de la méthode	64
III.3.b Description des expériences conduites	65
III.4 Les outils d'analyse	66
III.4.a La cytométrie en flux (CMF)	66
III.4.b La microscopie à épifluorescence et la microscopie électronique à transmission	69
III.4.c La DGGE	70
III.5 Les protocoles	70
III.5.a Dénombrements des micro-organismes en cytométrie en flux	70
III.5.b Dénombrements des protistes flagellés et ciliés en microscopie	73
III.5.c Utilisation de la microscopie électronique à transmission	74
III.6. ARTICLE I	75

III.6.a Contexte de l'étude	75
III.6.b Objectif de l'étude	76
III.6.c Principaux résultats obtenus.....	76
 CHAPITRE IV : Dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy	109
IV.1 ARTICLE II.....	109
VI.1.a Contexte de l'étude.....	109
VI.1.b Objectifs de l'étude	110
VI.1.c Principaux résultats obtenus	110
 IV.2 Dynamique des communautés microbiennes des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre 2004 et 2006.....	140
IV.2.a Suivis pluriannuels des données physico-chimiques.....	140
IV.2.b Description de la variabilité interannuelle et saisonnière de la dynamique des communautés microbiennes.....	146
IV.2.c Facteurs explicatifs de la dynamique des communautés microbiennes	160
 IV.3 Synthèse et discussion sur le suivi de la dynamique des communautés microbiennes	171
IV.3.a La RLM et l'ACRp pour appréhender les relations statistiques et le déterminisme de la dynamique des communautés microbiennes	171
IV.3.b Les facteurs biologiques et physico-chimiques déterminants dans l'évolution des dynamiques microbiennes	172
 CHAPITRE V : Impacts des virus sur les bactéries hétérotrophes et les picocyanobactéries appréhendés au moyen d'expériences <i>in situ</i>	181
V.1 Approches par la méthode de dilution	181
V.1.a Contexte et Objectifs	181
V.1.b Principaux résultats obtenus.....	182

V.1.c ARTICLES III, IV, V.....	182
V.2 Approche par la méthode de fractionnement des communautés et enrichissement viral :	253
V.2.a Contexte et objectifs.....	253
V.2.b Principaux résultats.....	254
V.3 Synthèse et discussion générale sur l'impact des virus et prédateurs flagellés sur la mortalité et la diversité bactérienne	260
V.3.a La méthode de dilution pour mesurer la prédation et la lyse virale sur les communautés microbiennes.....	260
V.3.b Importance de la lyse virale et de la prédation sur les communautés microbiennes des trois lacs péri-alpins	265
V.3.c Effet de la lyse virale et de la prédation sur la diversité des bactéries hétérotrophes du lac Léman	274
CHAPITRE VI : Conclusions et perspectives	279
BIBLIOGRAPHIE	291
ANNEXES	313
Annexe I : Article de vulgarisation dans <i>La Recherche</i> (2007).....	315
Annexe II : Article de vulgarisation dans <i>Le Courrier de l'environnement</i> (2006).....	321
Annexe III : Article de vulgarisation dans <i>l'INRA mensuel</i> (2005).....	339
Annexe IV : Tableaux des analyses canoniques de redondance polynomiale.....	341
Annexe V : Protocole détaillé d'extraction, de PCR et de DGGE.....	347

LISTE DES ARTICLES PRESENTES DANS CETTE THESE

ARTICLE I

Dorigo U., S. Personnic and S. Jacquet. Necessary tests for accurate counting of lake bacteria and viruses using either FCM or EFM. *Freshwater Biology* (en révision)

ARTICLE II

Personnic, S., I. Domaizon, U. Dorigo, S. Jacquet. Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio- and picophytoplankton in three peri-alpine lakes. *Freshwater Biology* (en révision)

ARTICLE III

Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, 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

ARTICLE IV

Duhamel, S., I. Domaizon, S. Personnic and S. Jacquet. 2006. Assessing the dynamics and role of bacteriophages as bacterial mortality agents in the Geneva Lake. *Journal of Water Sciences* 19:115-126

ARTICLE V

Personnic, S., I. Domaizon and S. Jacquet. Seasonal variations of virus- vs. flagellate-induced mortality of picoplankton in three peri-alpine lakes. *Microbial Ecology* (soumis)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I

Figure I-1 : Chronologie de quelques événements majeurs de 1955 à 2003 ayant marqué l'histoire de l'écologie virale aquatique.

Figure I-2 : Photographies de virus isolés (A-I) et de virus contenus dans des bactéries (J-R) des trois grands lacs péri-alpins. Les virus sont observés en microscopie électronique à transmission. Photographies fournies par Johnatan Colombet (Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023- U. Blaise Pascal).

Figure I-3 : Description des différentes structures caractérisant un virus de type T4, infectant la bactérie *Escherichia coli*. La fixation du phage sur la bactérie commence avec le contact d'une fibre de la queue avec le récepteur sur la surface bactérienne. Lorsque la plaque basale est déposée sur la surface cellulaire, la gaine se réorganise et le tube central est propulsé à travers la paroi bactérienne. Finalement l'ADN est expulsé de la tête à travers le tube de la queue et pénètre dans la cellule hôte. Source image : <http://www.bacteriophagetherapy.info>

Figure I-4 : Les organismes photosynthétiques (en vert), fixent le dioxyde de carbone atmosphérique par photosynthèse (grâce à l'énergie solaire) et puisent dans l'eau les nutriments minéraux. La matière organique dissoute qu'ils libèrent dans le milieu est assimilée par les bactéries hétérotrophes. Les bactéries sont ensuite consommées par les flagellés et ciliés hétéro- et mixotrophes. On utilise le terme de boucle microbienne pour qualifier la circulation de la matière organique via les bactéries hétérotrophes. Le métazooplancton (copépodes, rotifères, cladocères) est aussi un consommateur de bactéries, du phytoplancton, des flagellés et des ciliés. A chaque stade de cette chaîne trophique, des débris organiques et les nutriments minéraux sont relâchés dans l'eau (traits en pointillés). Les virus interviennent à la base de la chaîne trophique, en lysant les bactéries hétérotrophes, les cyanobactéries, et certains autres micro-organismes photosynthétiques. Ils contribuent à la redistribution de la matière organique dissoute.

Tableau I-1 : Estimation de la répartition de l'abondance et de la quantité de carbone des virus dans les eaux marines et d'eau douce de la planète.

Tableau I-2 : Noms et caractéristiques des groupes de phages actuellement décrits.

CHAPITRE II

Figure II-1 : Cartes bathymétriques des lacs Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C).

Tableau II-1 : Caractéristiques principales des trois lacs péri-alpins.

CHAPITRE III

Figure III-1 : Représentation graphique des résultats attendus. Deux diluants sont utilisés : sans prédateurs brouteurs et sans brouteurs ni virus ; et trois niveaux de dilution 20%, 40%, 70%. Le 100% est composé d'eau du lac non dilué.

Figure III-2 : Photographies de la mise en place de l'expérience de dilution : le système d'ultrafiltration utilisé (A), les microcosmes *in situ*, Bouteilles Nalgene (0,5 litres) hermétiques (B), les microcosmes *in situ* incubés à 1 mètre de profondeur dans le lac (C), le site d'incubation des microcosmes *in situ*, Port semi fermé de la station INRA d'hydrobiologie lacustre de Thonon les bains (B).

Figure III-3 : Figure illustrant le type de bouteilles hermétiques mises en place, avec leurs caractéristiques : filtration (<2 µm, <10 µm), contrôle et enrichissement en virus.

Figure III-4 : Photos des expériences de Fractionnement/Enrichissement sur le Lac Léman : Photo des systèmes de filtration utilisés (A) ; Photo des mésocosmes *in situ*, Bouteilles Nalgene (2.5 litres) hermétiques incubées à 1 mètre de profondeur dans le lac (B) ; Photo du site d'incubation des mésocosmes *in situ*, Port semi fermé de la station INRA d'hydrobiologie lacustre de Thonon les bains (C).

Figure III-5 : Schéma du principe de la cytométrie en flux (voir texte pour explications). Métézeau et al. (1988).

Figure III-6 : Les paramètres obtenus en cytométrie en flux : Diffusions lumineuses et fluorescences. Emis dans toutes les directions de l'espace, les signaux sont captés dans deux directions privilégiées : diffusion aux petits angles (FSC) et diffusion orthogonale (SSC et fluorescence). Source : Roland Greimers ©université de Liège

Figure III-7 : Signatures typiques obtenues en cytométrie en flux des picocyanobactéries (A, B, C), petits eucaryotes autotrophes (D, E, F), bactéries hétérotrophes (G, H, I), et des quatre groupes viraux (J, K, L) selon les paramètres cytométriques de taille SSC (size scatter) et de fluorescence FL1 (fluorescence verte), FL3 (fluorescence rouge).

Figure III-8 : Processus de dénombrement des virus VLP1 obtenus en cytométrie en flux (A) par projection sur l'axe FL1 (B) et modélisation par une courbe gaussienne (C) grâce au logiciel CYTOWIN (Vaulot 1989).

Tableau III-1 : Dates des différentes expériences de dilution conduites dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Tableau III-2 : Synthèse des analyses effectuées lors des expériences de fractionnement/enrichissement en fonction du temps d'incubation, T (exprimé en heures). CFM= analyses en cytométrie en flux, MET= analyses en microscopie électronique à transmission, MEF= analyses en microscopie électronique à épifluorescence.

CHAPITRE IV

Figure IV-1 : Séries temporelles obtenues pour les températures (A, B, C), la saturation en oxygène (D, E, F), la chlorophylle a (G, H, I) et la transparence (J, K, L) entre janvier 2004 et octobre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Figure IV-2 : Séries temporelles obtenues pour les données d'azote ammoniacal (A, B, C), d'azote nitrique (D, E, F), d'orthophosphates (G, H, I) et de silice réactive (J, K, L) entre janvier 2004 et octobre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Figure IV-3 : Développement des flagellés hétérotrophes (A, B) et des ciliés (C, D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman et du Bourget.

Figure IV-4 : Développement des pico-cyanobactéries (A), des petits (« Nano ») eucaryotes autotrophes (B), des bactéries hétérotrophes (C) et des virus (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac Léman.

Figure IV-5 : Développement des pico-cyanobactéries (A), des petits (« Nano ») eucaryotes autotrophes (B), des bactéries hétérotrophes (C) et des virus (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac du Bourget.

Figure IV-6 : Développement des pico-cyanobactéries (A), des petits (« Nano ») eucaryotes autotrophes (B), des bactéries hétérotrophes (C) et des virus (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac d'Annecy.

Figure IV-7 : Développement des VLP1 (A), des VLP2 (B), des VLP3 (C) et des VLP4 (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac Léman.

Figure IV-8 : Développement des VLP1 (A), des VLP2 (B), des VLP3 (C) et des VLP4 (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac du Bourget.

Figure IV-9 : Développement des VLP1 (A), des VLP2 (B), des VLP3 (C) et des VLP4 (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac d'Annecy.

Figure IV-10 : Evolution des VBR (« virus to bacteria ratio ») entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Figure IV-11 : Evolution des VBR (A, B, C), des VCR (D,E,F) et VER (G, H, I) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Figure IV-12 : Diagramme de dispersion des données de l'épilimnion des matrices « A » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour le lac Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer. Les zones en pointillées délimitent les périodes non stratifiées (N.S.) et stratifiées (S) de la colonne d'eau.

Figure IV-13 : Diagramme de dispersion des données de l'hypolimnion des matrices « A » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour le lac Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer.

Figure IV-14 : Diagramme de dispersion des données de l'épilimnion des matrices « B » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour le lac Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer.

Figure IV-15 : Diagramme de dispersion des données de l'hypolimnion des matrices « B » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour le lac Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer.

Tableau IV-1 : Température moyenne (calculée sur les trois années 2004, 2005, 2006) dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy à différentes profondeurs et à différentes périodes de l'année.

Tableau IV-2 : Saturation moyenne en oxygène (calculée sur les trois années 2004, 2005, 2006) dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy à différentes profondeurs et à différentes périodes de l'année.

Tableau IV-3 : Statistiques descriptives des valeurs de transparence calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006, dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Tableau IV-4 : Statistiques descriptives des valeurs d'azote ammoniacal (N-NH_4), d'azote nitrique (N-NO_3), d'ortho phosphate (P-PO_4) exprimé en $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de silice réactive (SiO_2) exprimé en mg.L^{-1} , calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Tableau IV-5 : Statistiques descriptives des bactéries hétérotrophes, virus, picocyanobactéries, petits eucaryotes autotrophes calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Tableau IV-6 : Statistiques descriptives de la part représentative de chaque groupe de virus (VLP1, VLP2, VLP3, VLP4) sur l'ensemble de la communauté virale dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre 2004 et 2006.

Tableau IV-7 : Statistiques descriptives des concentrations virales calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Tableau IV-8 : Valeurs de significativité de l'utilisation des variables explicatives : température (T°C), chlorophylle a (Chl. a), ammonium (NH₄), nitrate (NO₃), orto phosphate (PO₄), bactéries hétérotrophes (Bact. H.), virus, picocyanobactéries (Picocyanob.) et petits eucaryotes autotrophes (Nano Euc. A.) dans l'explication des variables dépendantes (bactéries hétérotrophes, virus, pico-cyanobactéries et petits eucaryotes autotrophes) en régression linéaire multiple (pas à pas) pour les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy dans l'épilimnion (0-15 mètres) durant les trois années 2004, 2005, 2006.

Tableau IV-9 : Valeurs de significativité de l'utilisation des variables explicatives : température (T°C), chlorophylle a (Chl. a), ammonium (NH₄), nitrate (NO₃), orto phosphate (PO₄), bactéries hétérotrophes (Bact. H.), virus, pico-cyanobactéries (Picocyanob.) et petits eucaryotes autotrophes (Nano Euc. A.) dans l'explication des variables dépendantes (bactéries hétérotrophes, virus, pico-cyanobactéries et petits eucaryotes autotrophes) en régression linéaire multiple (pas à pas) pour les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy dans l'hypolimnion (30-50 mètres) durant les trois années 2004, 2005, 2006.

Tableau IV-10 : Type de variables utilisée dans les différentes matrices (matrices « A ») de l'analyse canonique de redondance polynomiale (ACRp) et comparaison du pourcentage total de la variance expliquée par l'analyse canonique de redondance linéaire et polynomiale.

Tableau IV-11 : Type de variables utilisée dans les différentes matrices (matrices « B ») de l'analyse canonique de redondance polynomiale (ACRp) et comparaison du pourcentage total de la variance expliquée par l'analyse canonique de redondance linéaire et polynomiale.

CHAPITRE V

Figure V-1 : Résultats de l'analyse factorielle des profils de DGGE obtenus pour les eu-bactéries lors des expériences d'enrichissement et de fractionnement du mois d'avril et mai 2004 dans le lac Léman.

Tableau V-1 : Synthèse des caractéristiques physiques (température), chimiques (N-NH₄, N-NO₃, P-PO₄) et biologiques (chlorophylle a et taux de croissance bactérien) dans l'épilimnion du lac Léman (point central) au cours des deux expériences *in situ* de fractionnement et d'enrichissement.

Tableau V-2 : Abondances des communautés microbiennes (bactéries hétérotrophes, virus, flagellés hétérotrophes), % de mortalité bactérienne engendré par la lyse virale (VIBM) à T0 et T96 heures au cours de deux expériences *in situ* de fractionnement (2 et 10 µm) et d'enrichissement (E).

Tableau V-3 : Synthèse des résultats de la variation de la diversité des bactéries hétérotrophes entre 0 et 96 heures au cours de deux expériences *in situ* de fractionnement (2 et 10 µm) et d'enrichissement (E) au mois de mai et d'avril dans le lac Léman.

Tableau V-4 : Valeurs de prédation mesurées sur différentes communautés par la méthode de dilution de Landry & Hassett (1982).

Tableau V-5 : Part relative (%) de la lyse virale et de la prédation par les flagellés hétérotrophes dans la mortalité des bactéries hétérotrophes par trois approches expérimentales de dilution dans trois lacs péri-alpins (Léman, Bourget, Annecy) en 2003, 2004, 2005 et 2006.

Tableau V-6 : Part relative (%) de la lyse virale et de la prédation par les flagellés hétérotrophes dans la mortalité des picocyanobactéries par une approche expérimentale de dilution dans trois lacs péri-alpins (Léman, Bourget, Annecy) en 2005 et 2006.

Tableau V-7 : Valeurs de prédation et de lyse virale dans l'explication de la mortalité bactérienne (par jour) dans les études ayant mesurées simultanément ces deux processus.

LISTE DES ABREVIATIONS

CFM	Cytométrie en flux
DGGE	Denaturant gradient gel electrophoresis
FIC	Frequence of infected cells
FLB	Fluorescent bacteria
FMS	Fluorescent labelled microspheres
KCN	Potassium cyanide
LUCA	The last universal common ancestor
MEF	Microscopie à épifluorescence
MET	Microscopie électronique à transmission
PB	Production bactérienne
PFGE	Pulse field gel electrophoresis
RT	Radio traceur
VBR	Virus to bacteria ratio
VD	Viral decay
VIBM	Virus induced bacteria mortality

CHAPITRE I

Contexte scientifique et objectifs

CHAPITRE I : Contexte scientifique et objectifs

I.1 De la découverte des virus à l'écologie virale

I.1.a La fin du XIX^{ième} siècle et la naissance de la virologie

C'est en 1892 que le biologiste ukrainien Dimitry Iosifovich Ivanovsky (1864-1920) découvrit le premier virus. En 1887, Ivanovsky, chercheur à l'Université de St Petersburg, débuta ses recherches sur différentes maladies affectant la plante du tabac. Il découvrit, quelques années plus tard, que les maladies qu'il étudiait étaient toutes dues à un agent minuscule capable de traverser ses filtres de porcelaine, alors que les bactéries (considérées comme les plus petits agents pathogènes à l'époque) ne pouvaient pas le faire. Il publia ses résultats en 1894 dans un article où il qualifia de toxine l'agent responsable de la mosaïque du tabac (Ivanovski 1894). C'est le botaniste et microbiologiste néerlandais Martinus Willem Beijerinck (1851-1931) qui, quelques années plus tard, attribua à cette particule filtrable le terme de virus (issu du latin *virus* qui signifie « poison »). Il démontra, par l'emploi de filtres extrêmement fins, que l'agent pathogène responsable de la maladie de la mosaïque du tabac était plus petit qu'une bactérie et qu'il se multipliait seulement dans les cellules végétales vivantes. Il publia les résultats de sa recherche sur le virus de la mosaïque du tabac en 1898 et 1899 (Beijerinck 1898, 1899), ce qui lui permit d'obtenir la médaille Leeuwenhoek (récompensant le scientifique ayant réalisé la plus importante contribution à la microbiologie durant la décennie précédente) en 1905. Très rapidement, d'autres maladies furent attribuées aux virus, la stomatite aphteuse du bétail par Loeffler et Frosch (1897), la fièvre jaune par Reed et Carroll (Reed & Carroll 1902), etc... Ainsi au début du XX^{ième} siècle, il était officiellement établi que les virus pouvaient être responsables de maladies chez les plantes, le bétail et l'homme.

I.1.b Du début du XX^{ième} siècle jusqu'à la seconde guerre mondiale, F. D'Herrelle et les bactériophages

C'est en 1915 que Frederick Twort (1877-1950), professeur de bactériologie à l'Université de Londres, fit les premières observations de virus infectant les bactéries. Il travaillait sur des cultures de *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré) quand il s'aperçut que certaines colonies bactériennes étaient détruites. Il isola la « substance » produisant cet

effet et découvrit que le « contenu » de la substance était transmis indéfiniment aux générations bactériennes futures. Il proposa que la dite substance soit en fait un virus (Twort 1915). Mais, Twort ne poursuivant pas ses observations, c'est à Félix d'Herelle (1873-1949), biologiste canadien, que l'on attribua l'établissement définitif de l'existence de virus bactériens. D'Herelle, parallèlement aux travaux de Twort, démontra que ces virus ne se développaient que dans les bactéries vivantes et réalisaient des plages de lyse sur les tapis bactériens. Il leur donna le nom de bactériophages (*sensu stricto* « mangeurs de bactéries ») en 1917. Cette dénomination reste d'actualité puisque l'on parle toujours de (bactério)phages pour les virus infectant les organismes procaryotes. On y distingue principalement les bactériophages, virus des procaryotes hétérotrophes (eu-bactéries) et les cyanophages, virus des procaryotes autotrophes (cyanobactéries). Le nombre de virus varie dans les différents environnements et, le plus souvent, est étroitement lié à l'abondance des bactéries, suggérant que les virus présents dans l'environnement sont essentiellement des phages (Fuhrman 1999, Wommack & Colwel 2000, Weinbauer 2004), voir chapitres I.2.b et I.2.c). Dans les années à venir, ce terme de (bactério)phage pourrait disparaître et être remplacé par une nouvelle dénomination basée sur la lignée des cellules hôtes. Nous savons en effet aujourd'hui que tous les organismes cellulaires connus appartiennent à l'une des trois grandes lignées primordiales suivantes : les archées, les bactéries et les eucaryotes et aussi qu'il est devenu évident qu'un monde viral spécifique est associé à chacun de ces trois domaines (Prangishvili *et al.* 2006). Ainsi, Forterre (2006) a proposé que les virus puissent être renommés bacteriavirus, archaeavirus et eucaryavirus (bactérovirus, archéovirus, et eucaryovirus en français) afin d'éviter en particulier d'utiliser le terme ambigu de bactériophages (mangeurs de bactéries) inventé à une époque où leur nature parasitaire réelle n'était pas encore connue.

I.1.c La révolution virologique (1935-1965)

La nature chimique des virus fut établie lorsque Wendell M. Stanley (futur prix Nobel en Biochimie) annonça en 1935 qu'il avait cristallisé le virus de la mosaïque du tabac et avait trouvé que celui-ci était constitué essentiellement par des protéines (Stanley 1935). Quelques temps plus tard, Frederick C. Badwen et ses collaborateurs arrivèrent à séparer les particules du virus de la mosaïque du tabac en protéines et en acides nucléiques (Badwen *et al.* 1936). A la fin des années 1930, il devint clair que les virus étaient des complexes d'acides nucléiques et de protéines, capables de se reproduire uniquement dans les cellules vivantes. La période 1935-1965 va voir disparaître successivement tous les caractères « négatifs » (*i.e.*

les problèmes) qui définissaient jusqu'à présent les virus (Chastel 1992). En effet, les virus peuvent être cultivés, observés par microscopie électronique, purifiés, analysés du point de vue de leur composition chimique. De nombreux virus à cette période sont isolés à partir de tumeurs ou de leucémies chez l'animal et chez l'homme. Tous ces progrès vont révéler un monde nouveau, complètement différent de celui des bactéries et des protistes, mais aussi un monde complexe, rassemblant des agents aux formes diverses et de structures variées, ayant à leur disposition différentes « stratégies » pour infecter les cellules vivantes et modifier leur devenir (Chastel 1992).

I.1.d L'avènement de la virologie médicale (1965 à nos jours)

A la fin de l'année 1965, le prix Nobel de Médecine et de Physiologie fut attribuée à Jacques Monod, François Jacob et André Lwoff pour leurs travaux sur le contrôle génétique de la synthèse des enzymes et des virus (Jacob & Monod 1961, Lwoff 1957). Ce fut la reconnaissance officielle de la part prépondérante prise par les virus dans la naissance de la biologie moléculaire. C'est Lwoff qui proposa en 1957 une définition des virus qui sert encore de référence aujourd'hui : un virus a une petite taille, ne possède qu'un type d'acide nucléique (ARN ou ADN), ne possède pas d'enzymes capables de produire de l'énergie, est incapable de se multiplier par division binaire, et est un parasite intracellulaire obligatoire. Ce qui va caractériser les années écoulées entre 1965 à nos jours, c'est l'accélération des découvertes sur les caractéristiques et propriétés des virus connus ou suspectés. C'est souvent dans un contexte épidémiologique catastrophique, comme pour les fièvres hémorragiques africaines : Marburg (1967), Lassa (1970), Ebola (1976) et maintenant le Sida, que les moyens techniques développés et mis à la portée des virologistes leur permettent de faire face très rapidement aux problèmes posés par l'isolement et la caractérisation de ces virus, y compris l'analyse complète de leur génome par des approches de biologie moléculaire. Par exemple, pour le Sida, apparu officiellement en 1981, il n'a fallu que quelques années pour que soient isolées les deux souches de virus qui en sont responsables, le virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.) 1 et 2. Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1, plus répandu, et le virus de l'immunodéficience humaine de type 2, moins virulent et principalement retrouvé en Afrique de l'Ouest, ont été découverts en 1983 (Barre-Simoussi *et al.* 1983, Gallo *et al.* 1983) et en 1986 (Clavel *et al.* 1986).

I.1.e Les années 1990, et la naissance de l'écologie virale aquatique

L'écologie microbienne a émergé au début des années 1960, mais ce n'est qu'au début des années 1980 qu'elle s'est réellement établie comme une spécialité à part entière au sein des disciplines microbiologiques. Elle a pris toute son importance pour les milieux aquatiques, notamment grâce aux travaux d'Azam *et al.* (1983) qui mirent en évidence le rôle clef de l'activité des bactéries (*i.e.* la boucle microbienne) dans le réseau trophique pélagique. L'expression « écologie microbienne » est utilisée aujourd'hui pour étudier la distribution, de la dynamique et de la diversité des micro-organismes, des interactions entre communautés (des virus au protistes) en lien avec l'environnement et de leurs rôles fonctionnels au sein des écosystèmes. Les années 1990 ont vu l'introduction de la biologie moléculaire dans le champ de l'écologie microbienne, avec le développement de nouvelles techniques pour appliquer les méthodes moléculaires aux études environnementales (Giovanonni *et al.* 1990). Ces méthodes ont permis aux écologistes microbiens de commencer à explorer l'étendue de la biodiversité des micro-organismes. C'est à la même période que quatre chercheurs Berg, Borsheim, Bratbak & Heldal (1989) rapportèrent pour la première fois des concentrations de 4 à 10 millions de virus par millilitre d'eau de mer, suggérant alors que les virus puissent être l'entité biologique la plus abondante au sein des milieux aquatiques. L'importance des études en écologie virale pour la compréhension des écosystèmes aquatiques venait de naître (Fig. I-1). Un an après cette découverte, les virus furent désignés comme pouvant être les principaux acteurs dans le contrôle et la terminaison des efflorescences algales (Bratbak *et al.* 1990) et leur rôle comme agents régulateurs de la production primaire fût démontré expérimentalement (Suttle *et al.* 1990). L'importance des virus n'était plus simplement quantitative, elle devenait également fonctionnelle. Dans les années qui suivirent, de nombreux progrès sur les techniques d'analyses et notamment sur les techniques de dénombrement comme la microscopie électronique à transmission (Torrella & Morita 1979, Ewert & Paynter 1980, Field 1982, Goyal 1987, Binder 1999), la microscopie à épifluorescence (Hara *et al.* 1991, Hennes & Suttle 1995, Xenopoulos & Bird 1997, Noble *et al.* 1998) ou encore la cytométrie en flux (Marie *et al.* 1999, Brussard *et al.* 2000) permirent de décrire le compartiment viral aquatique avec précision. Les outils de la biologie moléculaire (techniques décrites dans Weinbauer 2004 par exemple), sont venus compléter rapidement les techniques de dénombrement des virus aquatiques. En moins de 20 ans, il a pu être démontré combien les activités virales sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques sont considérables. Il a ainsi été mis en évidence que les virus interviennent dans de nombreux

processus écologiques et biogéochimiques, tels que le recyclage des nutriments, la mortalité bactérienne et algale, et que les virus affectent également la diversité de l'ensemble du compartiment microbien de manière directe ou indirecte (Wommack & Colwell 2000, Weinbauer & Rassoulzadegan 2004). Ainsi, depuis le début du siècle, la prise de conscience de l'abondance et du rôle crucial des virus au sein des écosystèmes a permis à l'écologie virale de se développer et de s'établir comme une discipline à part entière.

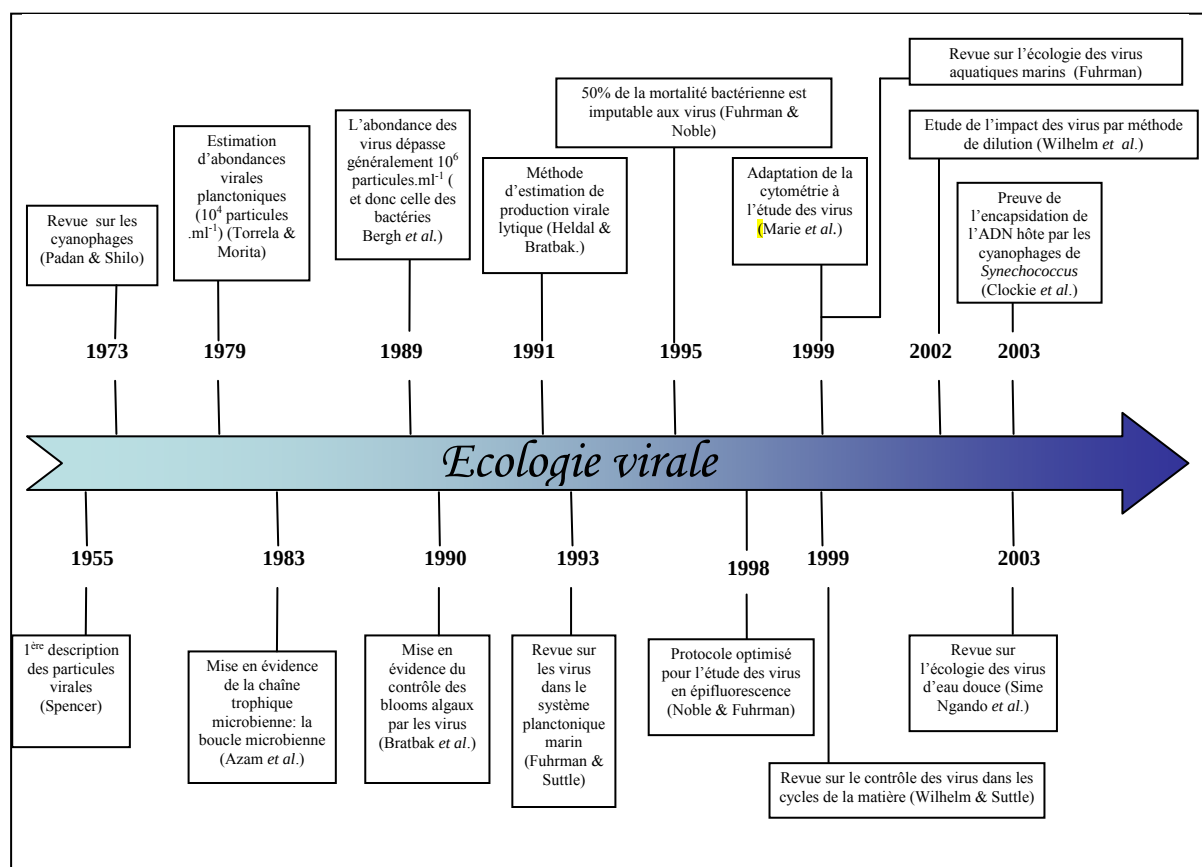


Figure I-1 : Chronologie de quelques événements majeurs de 1955 à 2003 ayant marqué l'histoire de l'écologie virale aquatique.

I.2 Caractéristiques morphologiques, abondance et diversité des virus en milieu aquatique

I.2.a Taille des virus

Le critère de taille est un paramètre systématiquement pris en compte pour séparer les communautés planctoniques afin de constituer des groupes fonctionnels d'intérêts majeurs. Bien que le choix des différentes classes de tailles puisse être discuté, cette ségrégation en

classes de taille apparaît très utile dans les approches de modélisation du fonctionnement des réseaux trophiques (Hulot *et al* 2000). Associé à un préfixe de taille (en lien avec le système métrique internationale), les différents organismes du plancton ont ainsi été séparés en 3 classes de taille majoritaires : le pico-, nano- et microphytoplancton et le nano-, micro- et mésozooplancton (Davis 1955, Barthelmes 1981, Hutchisson 1967).

Le virioplancton est repéré dans la classe de taille allant de 0,02 à 0,2 μm , appelé femtoplancton (Jacques & Treguer 1986). La classe de taille 0,2 à 2 μm (picoplancton) regroupe bactéries hétérotrophes et autotrophes (*i.e.* les picocyanobactéries essentiellement), ainsi que les plus petits eucaryotes ou picoeucaryotes (Jacques & Treguer 1986). Les protistes hétérotrophes/mixotrophes/autotrophes sont généralement considérés comme appartenant au nano- et microplancton, c'est-à-dire caractérisés par des tailles supérieures à 2 μm jusqu'à plusieurs centaines de μm (Dussart 1992). Au sein de ces protistes hétérotrophes (qui constituent la majorité des prédateurs bactériens), les flagellés hétérotrophes sont généralement recensés dans la fraction 2-10 μm et les ciliés hétérotrophes 20-200 μm .

La majorité des virus ont une taille comprise entre 30 et 60 nm. De nombreux exemples peuvent être mentionnés dans lesquels la majorité (exprimé en % de la totalité) des virus aquatiques sont en effet compris dans cet intervalle : dans l'Atlantique Nord à 69% (Bergh *et al.* 1989), dans les fjords de Norvège à 47% (Bergh *et al.* 1989), dans le sud de la Californie à 63% (Cochlan *et al.* 1993), dans l'Adriatique Nord à 72% (Weinbauer & Peduzzi 1994), en mer d'Alboran à 73% (Alonso *et al.* 2001), etc. Cependant, il existe au moins deux exemples ayant révélé que la majorité des virus n'appartienne pas forcément à cette classe de taille. Dans la rivière Danube (Autriche), 84% des virus ont une taille supérieure à 60 nm (Mathias *et al.* 1995) et dans le lac Supérieur (Etats Unis) 50% des virus ont une taille inférieure à 30 nm (Tapper & Hicks 1998). De nombreux travaux ont prouvé l'existence de virus beaucoup plus grands, variant entre 200 et 700 nm, dans les écosystèmes marins et d'eau douce (Sommaruga *et al.* 1995, Kepner *et al.* 1998, Pina *et al.* 1998, Wilson *et al.* 2005). Récemment une équipe de chercheurs de la faculté de médecine de Marseille a mis en évidence un virus, à capsid icosaédrique faisant 800 nm (Raoult *et al.* 2004). L'amibe (un protiste hétérotrophe) cellule hôte de ce virus a été trouvé en milieu liquide, dans une tour de refroidissement de l'hôpital de Bradford (Angleterre). La découverte de ce virus, d'abord assimilé à une bactérie dénommée *Bradford coccus* d'où par la suite son nom de Mimivirus (qui vient de l'anglais 'Mimiking Microbe' pour reconnaître que le virus a imité une bactérie pendant longtemps), a créé une véritable effervescence dans la communauté scientifique car il possède un génome énorme (1,2 millions de bases), plus gros que celui de nombreuses

bactéries séquencées et bien entendu le plus gros décrit à ce jour pour un virus. Les tailles des génomes viraux sont dans la plupart des études, en milieux marins, comprises entre 12 et 630 kilobases, pour une moyenne de 50 kilobases (Steward *et al.* 2000, Weinbauer 2004). De part ses caractéristiques, ce virus dans les années à venir pourrait être à l'origine d'une modification de notre conception de l'arbre phylogénétique eucaryotes-eubactéries-archaebactéries et d'une modification radicale de la compréhension des origines de la vie (Raoult *et al.* 2004, Claverie 2006, voire chapitre I.2.d).

I.2.b Abondance des virus

Depuis la fin du XX^{ième} siècle, nous savons que les virus, selon les différents milieux aquatiques étudiés, ont une concentration moyenne variant entre 10^4 et 10^8 particules par millilitre (Wommack & Colwell 2000). De manière générale, il semble que le nombre de virus augmente avec la productivité du système (Weinbauer *et al.* 1995, Bettarel *et al.* 2004) : plus le milieu est productif, plus le nombre de virus est important. Paul (2000) a montré que les virus ont en moyenne des concentrations de 10^4 à 10^5 particules par millilitre dans l'océan profond, de 10^5 à 10^6 particules par millilitre en surface et de 10^6 à 10^7 particules par millilitre dans les zones côtières. De plus, il semble que les concentrations soient généralement supérieures dans les eaux douces comparativement au milieu marin (Maranger & Bird 1995). Les concentrations en estuaire ou en lac peuvent même atteindre 10^8 particules par millilitre. Dans les sédiments, les concentrations décroissent très rapidement avec la profondeur au sein de ces derniers mais elles restent cependant très supérieures (10 à 1000 fois) aux concentrations retrouvées dans la colonne d'eau sus-jacente (Steward *et al.* 1996, Hewson *et al.* 2001, Duhamel & Jacquet 2006). L'ensemble de ces valeurs moyennes est probablement fortement variable sur des échelles d'espace et de temps courts. Les travaux récents de Seymour *et al.* (2006) rappellent les difficultés d'appréhender les notions d'échelle en écologie virale tant il est vrai que la variabilité des concentrations de virus à micro-échelle (quelques centimètres) puisse être très importante. Les virus pourraient en effet former des patches (« hotspots »), dans lesquels ils seraient hautement concentrés suite à un événement de lyse majeure par exemple. Dans le cadre récurrent de la comparaison des résultats entre études, les variables clefs que sont le temps (périodes de prélèvement, fréquence d'échantillonnage...) et l'espace (lieu de prélèvement, volume prélevé...), sans parler du contexte biologique (efflorescence, etc) doivent donc être considérées avec attention. De plus, ces deux types de

variables n'ont pas le même poids selon le lieu, le moment et les communautés étudiées (des bactéries aux poissons).

Les données de synthèse fournies par la bibliographie démontrent que les virus constitueraient un réservoir de 10^{27} particules dans l'océan global soit un total de 20-200 Mt de carbone, si l'on considère qu'une particule virale contient 0,2 femtogramme ($1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$) de carbone (Wilhelm & Suttle 1999). A titre comparatif, l'eau douce représentant 2,6% de l'eau totale à la surface de la terre, les virus y constitueraient donc un réservoir de 10^{25} particules soit 0,2-2 Mt de carbone. Pour les lacs, ce chiffre « chuterait » à 10^{22} particules pour 2-20 Kt de carbone.

Tableau I-1 : Estimation de la répartition de l'abondance et de la quantité de carbone des virus dans les eaux marines et d'eau douce de la planète.

	Volume en (Km^3)*	Part relative de l'eau de la planète (%)	Concentration moyenne en virus (part.L^{-1})	Nombre total de virus	Virus (Mt de C)	Références
Océans, mers...	1 350 000 000	97,50	10^9 - 10^{11}	10^{27}	270	Wilhelm & Suttle (1999)
Eaux douces	35 976 700	2,60	10^9 - 10^{11}	10^{25}	2	Maranger & Bird (1995)
<i>Glaciers</i>	27 500 000	1,98	9.10^9 - $1,3.10^{11}$	$7,64E+24$	0,2	Maranger <i>et al.</i> (1994)
Eaux souterraines	8 200 000	0,59				
<i>Lacs d'eau douce</i>	100 000	0,01	10^9 - 10^{11}	$2,78E+22$	0,002	Maranger & Bird (1995)
<i>Rivières</i>	1 700	0,000001	10^{10}	$4,73E+20$	0,000002	Mathias <i>et al.</i> (1995)

*D'après Marsily (1995)

I.2.c Diversité virale

Des travaux de recherche récents ont mis en évidence l'énorme réservoir de diversité génétique virale constitué par la colonne d'eau ou les sédiments marins (Breitbart *et al.* 2002, Edwards & Rohwer 2005, Suttle 2005, Angly *et al.* 2006). Un virus est au minimum spécifique d'une cellule hôte donnée. Il est donc caractéristique au minimum d'une espèce, voire même d'une variété ou souche de cette espèce. On estime actuellement, selon les différents écosystèmes étudiés, que 75 à 90% des virus seraient des phages, c'est-à-dire des virus utilisant des cellules procaryotes (essentiellement les bactéries) pour se multiplier (Fuhrman 1999, Wommack & Colwell 2000, Weinbauer 2004). Depuis la découverte de grandes concentrations de virus en milieu aquatique (Bergh *et al.* 1989), la microscopie électronique à transmission (TEM) a permis dans un premier temps de révéler la grande

diversité morphologique des phages. C'est en 1967, que Eisenstark publia la première liste, décrivant 111 phages de morphologies différentes (Eisenstark 1967). Une seconde liste fut publiée par Fraenkel-Conrat en 1974, incluant 411 virus de bactéries (Fraenkel-Conrat 1974). Actuellement, environ 5600 phages ont été décrits et classés dans 17 familles et trois groupes indéterminés différents (Ackerman 2001, 2007). Les virus polyédriques, filamenteux et pléomorphes représentent 3-4% des virus décrits par la microscopie électronique à transmission. Les virus avec une queue (nommés *Caudoviridae*) représentent 96% de ces virus, et sont regroupés dans trois familles les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*. De ces 96%, 61% des virus possèdent une queue longue, non contractile et sont issus de la famille des *Siphoviridae* (Tableau I-2).

Tableau I-2 : Noms et caractéristiques des groupes de phages actuellement décrits.

Groupe	Caractéristiques	Type d'ADN
<i>Corticoviridae</i>	Capside icosaédrique, couche lipidique	ADN double brin circulaire en super hélice
<i>Fuselloviridae</i>	Pléomorphe, enveloppé et sans capsid	ADN double brin circulaire en super hélice
<i>Inoviridae</i> genus <i>Inovirus</i>	Long filaments avec une symétrie en hélice	ADN simple brin circulaire
<i>Inoviridae</i> genus <i>Plectrovirus</i>	Long filaments avec une symétrie en hélice	ARN double brin, 3 molécules
<i>Lipothrixviridae</i>	Enveloppe filamenteuse, couche lipidique	ADN double brin linéaire
<i>Microviridae</i>	Capside icosaédrique	ADN simple brin circulaire
<i>Plasmaviridae</i>	Pléomorphe, enveloppé, sans capsid et couche lipidique	ADN double brin circulaire en super hélice
<i>Tectiviridae</i>	Queue pour injecter l'ADN, capsid icosaédrique avec une vésicule lipoprotéique	ADN double brin linéaire
<i>Rudiviridae</i>	Couche hélicoïdale	ADN double brin linéaire
<i>Leviviridae</i>	Capsid quasi icosaédrique	ARN simple brin, 1 molécule linéaire
<i>Cystoviridae</i>	Capsid icosaédrique, couche lipidique et enveloppé	ARN double brin, 3 molécules linéaires
<i>Myoviridae</i> , A1	Queue contractile, tête isométrique	
<i>Myoviridae</i> , A2	Queue contractile, tête allongée (rapport Longueur/largeur = 1.3-1.8)	
<i>Myoviridae</i> , A3	Queue contractile, tête allongée (rapport Longueur/largeur >2)	
<i>Podoviridae</i> , C1	Queue petite et non contractile, tête isométrique	
<i>Podoviridae</i> , C2	Queue petite et non contractile, tête allongée (rapport Longueur/largeur = 1.4)	
<i>Podoviridae</i> , C3	Queue petite et non contractile, tête allongée (rapport Longueur/largeur > 2.5)	
<i>Siphoviridae</i> , B1	Queue Longue et non contractile, tête isométrique	
<i>Siphoviridae</i> , B2	Queue Longue et non contractile, tête allongée (rapport Longueur/largeur = 1.2-2)	
<i>Siphoviridae</i> , B3	Queue Longue et non contractile, tête allongée (rapport Longueur/largeur > 2.5)	

***D'après H-W Ackerman & ST Abedon (2000)**

Le comité international travaillant sur la taxonomie des virus (l'ICTV pour « *International Committee on Taxonomy of Viruses* ») a établi depuis 1966 un système universel de classification des virus. Le système utilise les taxa connus. Les virus ne forment pas un règne à proprement parler comme c'est le cas pour les végétaux ou des animaux, et pour la plupart des scientifiques, les virus ne sont même pas considérés comme des organismes vivants. Comme nous l'avons déjà spécifié plus haut, la découverte de Mimivirus et d'autres virus géants, dont les gènes préfigurent ou ressemblent à ceux des cellules eucaryotes, pourrait modifier cette vision dans les prochaines années. Ceci est d'autant plus vrai quand on sait que Mimivirus possède de l'ADN et de l'ARN (le dogme selon lequel un seul type d'acide nucléique est trouvé par virus devant donc tombé, voir plus loin).

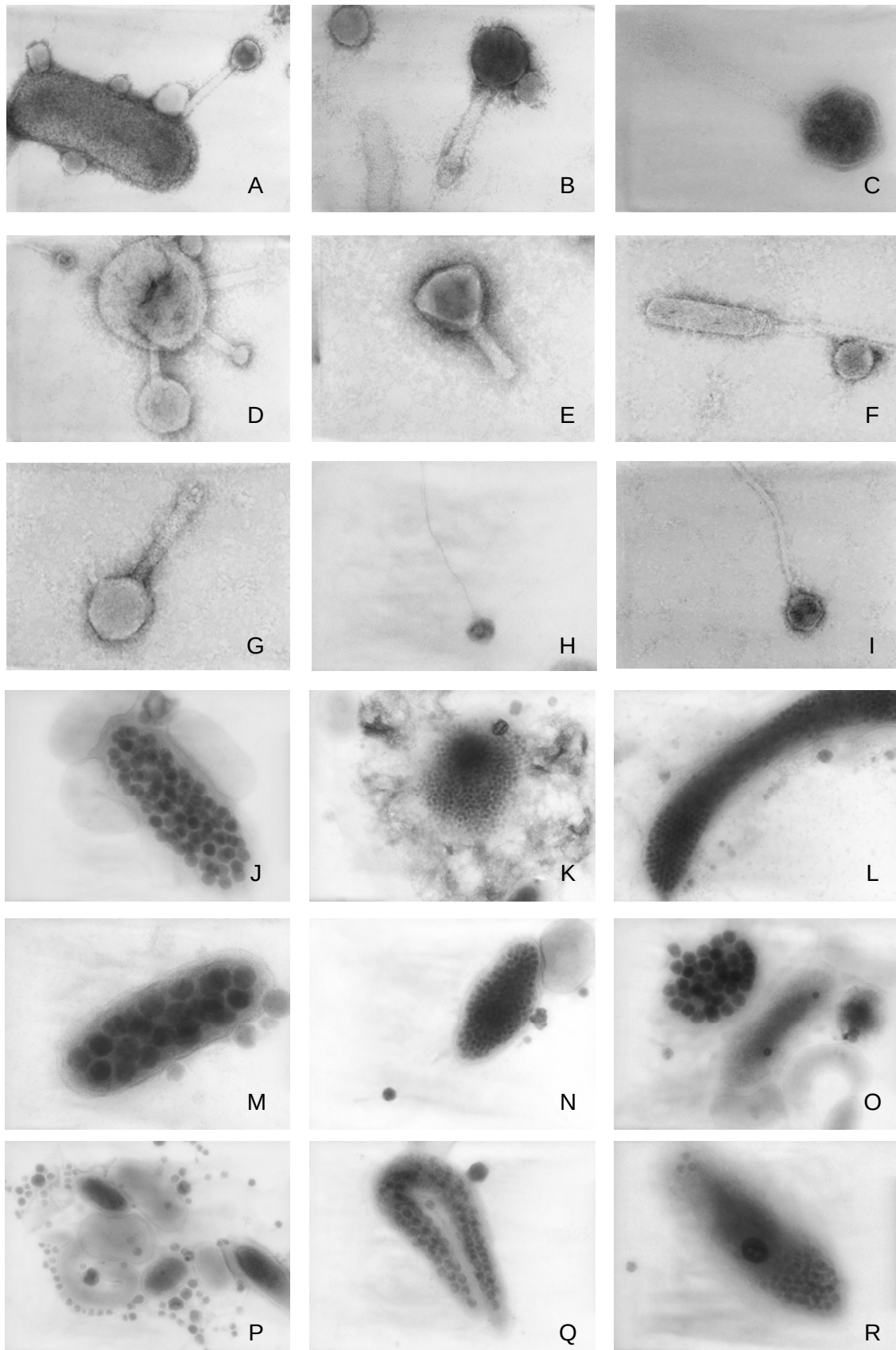


Figure I-2 : Photographies de virus isolés (A-I) et de virus contenus dans des bactéries (J-R) des trois grands lacs péri-alpins. Les virus sont observés en microscopie électronique à transmission. Photographies fournies par Johnatan Colombet (Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023- U. Blaise Pascal).

Face à cette complexité taxonomique, on utilise préférentiellement le terme de particules virales. On peut rencontrer également dans la littérature le terme de virion désignant la particule virale complète avec son enveloppe protéique externe (capside) et sa molécule d'acide nucléique d'ARN ou d'ADN. Le concept « d'espèce » est néanmoins appliqué aux particules virales. Actuellement, les « espèces » virales sont classées selon 5 principaux critères : (i) la nature de l'acide nucléique: (ADN ou ARN) ; (ii) le nombre de brins dont il est constitué (simple ou double) ; (iii) la présence ou non d'une enveloppe autour de la capsid; (iv) la symétrie de la capsid (hélicoïdale ou icosaédrique) et (v) la taille du virus (Fig. I-3).

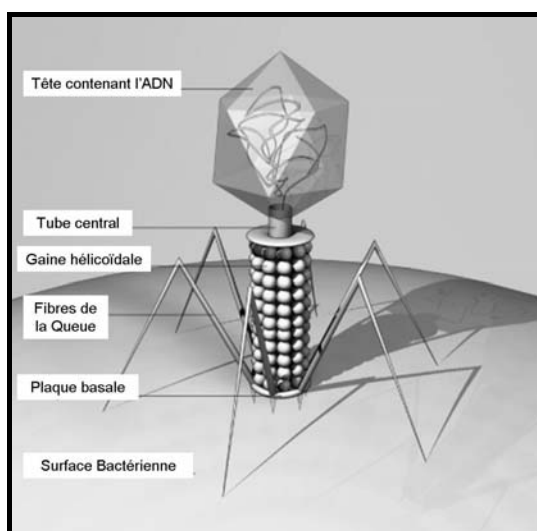


Figure I-3 : Description des différentes structures caractérisant un virus de type T4, infectant la bactérie *Escherichia coli*. La fixation du phage sur la bactérie commence avec le contact d'une fibre de la queue avec le récepteur sur la surface bactérienne. Lorsque la plaque basale est déposée sur la surface cellulaire, la gaine se réorganise et le tube central est propulsé à travers la paroi bactérienne. Finalement l'ADN est expulsé de la tête à travers le tube de la queue et pénètre dans la cellule hôte. Source image : <http://www.bacteriophagetherapy.info>

Depuis le milieu des années 1990, et l'avènement des outils de la biologie moléculaire (à savoir la PCR « Polymerase Chain Reaction », la RT-PCR « Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction », la QPCR « Quantitative Polymerase Chain Reaction », la DGGE « Denaturing Gradient Gel Electrophoresis », la PFGE « Pulsed Field Gel Electrophoresis » ...), un nombre croissant d'études a révélé l'incroyable diversité virale associée aux microorganismes aquatiques (Suttle 2000, Breitbart *et al.* 2002, Venter *et al.* 2004). Cependant, comme il n'existe pas de gène universel commun à l'ensemble des virus, il est impossible d'accéder à la diversité virale non cultivable en utilisant des approches analogues au profilage de l'ADN ribosomal comme cela est classiquement établi pour les

bactéries ou les eucaryotes par le biais des PCR. En effet, l'étude du génome de ces cellules passe généralement par une étape obligatoire d'amplification du matériel génétique qui utilise des séquences cibles universels présentes sur l'ARN ribosomal 16s et 18s des bactéries et eucaryotes respectivement (Innis *et al.* 1990). Aujourd'hui, les analyses de type métagénomique des communautés virales permettent de palier l'absence de gènes universels chez les virus et permettent de fournir de nombreux résultats sur la structure et la composition des communautés naturelles (Edwards & Rohwer 2005). Cette approche d'étude de la biodiversité est basée sur le séquençage de tout l'ADN d'un échantillon et sur une analyse bio-informatique puissante. La comparaison des séquences obtenues avec celles déjà répertoriées dans les bases de données permet de les attribuer soit à des organismes déjà connus, soit à des organismes nouveaux. L'approche métagénomique virale a débuté en 2002 quand Breitbart *et al.* (2002) publièrent pour la première fois le séquençage partiel de deux communautés virales non cultivables. Ils ont estimé l'existence de plus de 7000 génotypes viraux dans un échantillon d'eau de mer de seulement 200 litres. Cette estimation surpasse celles données pour la diversité bactérienne et supporte l'idée que la diversité virale est sûrement la plus grande diversité existante pour un groupe biologique donné (Edwards & Rohwer 2005). En 2006 des chercheurs américains et canadiens (Angly *et al.* 2006) ont publié leurs résultats d'analyses par approche métagénomique de 184 échantillons collectés dans 68 sites répartis dans la mer des Sargasses, le golfe du Mexique, les côtes de Colombie britannique et l'océan Arctique. Ils ont pu estimer que 91% de toutes les séquences virales repérées étaient inconnues. De plus leurs analyses ont montré que la plupart d'entre elles sont présentes dans les différents biotopes étudiés, mais en proportions variables. Il est donc possible que chaque région puisse avoir son propre « biome viral » (ou « virome »). Les auteurs concluaient en effet qu'il existe probablement des centaines de milliers d'espèces virales dans l'océan, très largement distribuées, avec quelques régions contenant probablement la majorité d'entre elles.

I.3 Origine des virus et rôle dans l'évolution des lignées cellulaires

Certains travaux ont proposé récemment l'hypothèse selon laquelle les virus pourraient être à l'origine de la présence de l'ADN dans les cellules. Les chercheurs à l'origine de ces travaux, ont en effet établi que les virus existaient sans doute déjà à l'époque de LUCA (the Last Universal Common Ancestor, Ridley 2000) et même bien avant, ce qui expliquerait l'existence de caractères homologues chez des virus infectant des cellules

appartenant à des lignées différentes. Les premiers virus seraient apparus dans un monde déjà peuplé de cellules à ARN (Forterre 2005), en accord avec l'idée largement répandue selon laquelle les virus à ARN sont des rescapés de cette époque lointaine. Ils seraient apparus soit par autonomisation de fragments génomiques, soit à partir de cellules à ARN, elles-mêmes parasites intracellulaires d'autres cellules à ARN (Forterre 2005, 2006). Quant aux virus à ADN, ils seraient apparus après les virus à ARN, soit directement à partir de ces derniers (origine virale de l'ADN, Forterre 2005, 2006) soit, dans le cas des gros virus, à partir de cellules « primitives » à ADN ou de noyaux de cellules proto-eucaryotes (Claverie 2006). Pour expliquer l'origine de l'ADN des trois lignées eucaryotes, archées et eubactéries, Forterre (2006) suppose que trois virus auraient intégré leur ADN au sein de trois cellules à ARN, à différents endroits du globe permettant le développement des trois lignées. Par compétition, toutes les cellules à ARN auraient disparu, ne laissant place qu'aux eucaryotes, archées et eubactéries. Au moment de la formation des trois lignées (eucaryotes, archées et eubactéries), chacune d'entre-elle aurait « entraîné » avec elle une partie différente de la virosphère ancestrale (Prangishvili *et al.* 2006).

I.4 Les différents cycles de vie des virus

Les virus ne présentent aucune forme de métabolisme autonome. Pour tout processus requérant de l'énergie, y compris la réplication, ils doivent avoir recours à une cellule hôte sensible et permmissible. Le cycle de réplication chez les virus comprend 4 étapes fondamentales: (i) la fixation (adsorption), la pénétration (via un récepteur membranaire généralement impliqué dans la prise de nutriments) et la décapsidation, (ii) la réplication (duplication du génome, transcription, traduction), (iii) l'assemblage des constituants viraux et, (iv) la libération des virus nouvellement formés. La phase comprise entre l'adsorption du virus et sa libération dans le milieu est appelée phase de latence (Abedon *et al.* 2001). On qualifie la phase d'assemblage de la capsid et du génome en phage mature de période éclipse (car le virus passe d'un état visible à invisible puis réapparaît). Le cycle viral en 4 étapes est dit de type lytique quand la libération des virus se fait par lyse (éclatement) de la cellule hôte, de type chronique quand elle se fait par bourgeonnement ou par extrusion de filaments de la membrane de la cellule hôte et enfin de type lysogénique quand le matériel ADN du virus s'intègre à celui de la cellule hôte pour être répliqué à chaque division de l'hôte (Weinbauer 2004).

I.4.a Le cycle lytique

Dans le cycle lytique, le phage va rediriger le métabolisme de la cellule hôte, pour produire de nouveaux virus qui seront ensuite libérés lors de la lyse cellulaire. Le nombre de « virions » re-largué par cellule dans l'environnement est qualifié de « burst size » (nombre maximum de particules produites) en anglais. Ackermann (1999) a pu mettre en évidence, pour des virus à queue, une action conjointe d'endolysines (hydrolases des peptidoglycannes) et d'holins pour détruire la membrane de la cellule hôte. Il existe différentes méthodes (actuellement 6) pour mesurer l'impact de la lyse virale sur leur cellule hôte reposant sur :

- l'observation directe, en microscopie électronique à transmission (MET), de virus matures à l'intérieur de coupes cellulaires ou de bactéries entières (Proctor & Fuhrman 1990). Un facteur de conversion est utilisé afin de convertir le nombre de bactéries visiblement infectées en nombre de bactéries réellement infectées (Weinbauer *et al.* 2002) car les virus intracellulaires ne sont visibles en MET qu'à la fin de leur cycle lytique ;
- l'utilisation d'un antibiotique pour provoquer la lyse des cellules bactériennes infectées et la libération des virus intra-cellulaires qui sont ensuite dénombrés (Heldal & Bratbak 1991) ;
- l'utilisation d'un inhibiteur du métabolisme bactérien (comme le cyanide de potassium KCN) et, par conséquent, de la production virale (Heldal & Bratbak 1991). Sachant que les virus des systèmes aquatiques sont des entités biologiques généralement incapables de subsister à l'état libre, leur présence dans le milieu indique généralement qu'il s'agit de virus néoformés. Par conséquent, l'estimation du taux d'élimination des virus après traitement au KCN, est donc équivalent au taux de production virale nécessaire pour expliquer l'abondance des virus en suspension dans des échantillons témoins ;
- l'incorporation de thymidine tritiée dans le génome viral (Steward *et al.* 1992), méthode reprenant les principes de mesure de la production bactérienne ;
- la concentration de virus suivie à l'aide d'un marquage avec un fluorochrome. Les virus sont eux-mêmes utilisés comme traceurs dans les échantillons naturels. Pendant l'incubation, l'importance relative des virus marqués diminue contrairement à celle des virus non marqués, permettant l'estimation de la production virale (Noble & Fuhrman 2000) ;

- l'utilisation d'une méthode de dilution. Les virus sont dilués graduellement et donc réduits en abondance dans un échantillon naturel afin de diminuer notablement la probabilité de rencontre avec les cellules hôtes non infectées. L'apparition de néo-virus libres dans de telles conditions représente donc la production virale provenant de la lyse des cellules hôtes déjà infectées (Wilhelm *et al.* 2002). Récemment Evans *et al.* (2003) ont aussi modifié cette technique pour mesurer conjointement la lyse virale et la prédation (voir chapitre III).

Actuellement aucune méthode ne semble se démarquer pour fournir une estimation précise et exacte de la mortalité engendrée par les virus (Suttle 2005) bien que celle basée sur la microscopie électronique à transmission soit prépondérante dans la littérature. Selon les écosystèmes étudiés, la contribution des virus dans la mortalité des communautés semble être indétectable jusqu'à expliquer 100% de la mortalité rencontrée (Jacquet *et al.* 2005), ce qui reflète de très grandes variations de la lyse virale dans l'espace et le temps. Le nombre de virus re-largués dans le milieu semble varier de quelques virus à plus de 500 phages par événement de lyse bactérienne (Wommack & Colwell 2000). Ce chiffre peut atteindre plusieurs milliers pour les virus de microalgues (Bratbak *et al.* 1990, Nagasaki *et al.* 1994, Tarutani *et al.* 2000, Castberg *et al.* 2002). Wommack & Colwell (2000) ont estimé que le nombre moyen de bactériophages re-largués dans le milieu est de 24. De manière plus générale l'estimation de la mortalité engendrée par les virus ne semble avoir guère évolué depuis 10 ans. On estime que les virus sont en moyenne capable de lyser 20 à 40% de la communauté bactérienne par jour (Suttle 1994, Weinbauer & Peduzzi 1995, Steward *et al.* 1996, Guixa-Boirereu *et al.* 1999, Wommack & Colwell, 2000, Sime Ngando *et al.* 2003, Bettarel *et al.* 2003, Pradeep Ram *et al.* 2005), et que les virus ont donc approximativement un impact identique à la consommation exercée par les prédateurs (Fuhrman & Noble 1996, Jacquet *et al.* 2005). Mais là encore, gardons à l'esprit que les échelles de temps et d'espace font que nous n'avons qu'une image simplifiée et très moyennée de ce processus et des chiffres qu'on lui associe.

I.4.b Le cycle lysogénique

Dans le cycle lysogénique, l'ADN du virus s'intègre dans le génome de la cellule hôte il prend alors le nom de « provirus ». Celui-ci sera répliqué à chaque division bactérienne, permettant ainsi une multiplication du virus sans provoquer la mort de la cellule hôte. Ce

provirus ou « prophage » (si la cellule hôte est une bactérie) peut être « activé » par la modification de facteurs environnementaux et « reprendre » un cycle lytique, avec réplication du génome viral et lyse de la cellule hôte. De nombreux facteurs ou processus semblent être capables d'induire la mise en place d'un cycle lysogénique: le rayonnement solaire, les changements de température ainsi que divers composés comme le peroxyde d'hydrogène, les hydro-carbones poly-aromatiques, le trichloréthylène, les mixtures de polychlorinate biphényles, l'arochlor 1248, les mixtures de pesticides, etc (Cochran *et al.* 1998, Weinbauer & Suttle 1999). Différents auteurs ont pu estimer, dans différents écosystèmes, que 47% (Ackerman & Dubow 1987), 40% (Jiang & Paul 1994, 1998), 80% (Ortmann *et al.* 2002) des virus seraient en cycle lysogène. Weinbauer (2004) grâce à une revue complète du % de virus lysogènes (par induction des prophages avec de la mitomycin C qui est un antibiotique préparé à partir d'une souche de bactéries du genre *Streptomyces*) a pu illustrer que la lysogénie concerne entre 0 et 100% des virus selon les écosystèmes ! Aucun scénario, facteur et/ou condition particulière n'expliquent donc actuellement de façon définitive cette variation de virus lysogènes dans les écosystèmes. Cependant Williamson *et al.* (2002) ont quand même pu mettre en évidence des fractions beaucoup plus importantes de lysogènes pour des taux de production bactérienne et primaire faibles. Ainsi, dans les environnements dits extrêmes, le pourcentage de bactéries lysogènes est souvent plus élevé (Colombet *et al.* 2006, Sawstrom *et al.* 2007). Wilson & Mann (1997) ont également montré le rôle des éléments nutritifs dans l'alternance du cycle lytique/lysogénique, une carence en un élément se traduisant par une plus grande importance relative du cycle lysogénique.

I.4.c Le cycle chronique

L'infection chronique affecte aussi le métabolisme cellulaire mais contrairement au cycle lytique, les cellules ne sont pas lysées. En écologie virale, les études s'intéressent majoritairement aux cycles lytique ou lysogénique. Ceci est dû, essentiellement à l'incapacité de visualiser par les techniques actuelles (voir chapitre I.3.a) la diffusion des virus à travers la membrane. Ce cycle chronique n'a été mis en évidence, ou tout du moins suspecté en milieu aquatique, qu'une seule fois. Hofer & Sommaruga (2001) ont en effet détecté, dans un lac alpin (Lac Gossenköllesee, Autriche), une bactérie contenant un virus filamenteux. Les auteurs, sur la base des travaux de Marciano *et al.* (1999), ont proposé que ce virus filamenteux puisse utiliser la diffusion sans détruire la membrane cellulaire pour se disperser dans l'environnement, comme le fait le virus filamenteux f1 de la bactérie *Escherichia coli*.

Le phage utiliserait une protéine (pIV) pour réaliser cette diffusion. Cette protéine filamenteuse aurait des séquences similaires aux protéines du système d'excrétion des bactéries. Cependant, d'après les caractéristiques de taille du virus, ces mêmes auteurs ont émis quelques doutes quant aux capacités du virus filamenteux de diffuser à travers la membrane sans détruire la bactérie hôte.

I.5 Rôles fonctionnels des virus au sein des écosystèmes aquatiques

I.5.a Le réseau trophique aquatique, la boucle microbienne et les virus

En écologie, la compréhension du fonctionnement biologique des écosystèmes est basée en grande partie sur l'analyse des relations trophiques entre différentes communautés. Dans les années 1970-80, Azam *et al.* (1983) proposèrent une modification du concept de la chaîne alimentaire classiquement décomposée en 4 compartiments : phytoplancton -> mesozooplancton -> poissons planctonophages -> poissons piscivores. Ils introduirent dans ce schéma le compartiment bactérien et la notion de boucle microbienne (Fig. I-4) symbolisant la circulation de la matière organique via les bactéries hétérotrophes et la consommation de ces dernières par des protistes flagellés et/ou ciliés pouvant eux même être la proie du métazooplancton. Ce concept de boucle microbienne (Azam *et al.* 1983) permit alors de comprendre le recyclage important de la matière organique issue notamment de la production primaire vers les niveaux trophiques supérieurs (Fig. I-4).

Si l'existence et l'importance du réseau trophique classique également nommé réseau herbivore ou métazooplanctonique (nutriments-phytoplancton-zooplancton-poissons) et du réseau trophique microbien (MOD-Bactéries/picophytoplancton-Protistes hétérotrophes) sont aujourd'hui bien établies, la part prépondérante de l'une ou l'autre de ces voies dans le fonctionnement global des réseaux pélagiques est encore mal appréciée. La complexité des interactions s'établissant au sein des réseaux trophiques planctoniques est liée à la multitude des effets directs et indirects qui peuvent exister entre les divers groupes fonctionnels. La découverte de la grande quantité de virus aquatiques (Bergh *et al.* 1989) a aussi modifié la vision que l'on avait du réseau trophique, en particulier au travers de la prise en compte de l'impact que pouvaient avoir les virus sur les différentes communautés microbiennes. La lyse virale aurait une action considérable sur les flux de carbone au niveau de chaque niveau trophique en transformant la matière particulaire en matière dissoute (Bratbak *et al.* 1994). Les virus créeraient ainsi des courts – circuits (« viral shunt », Wilhelm & Suttle 1999) dans

le transfert de la matière au niveau de chaque communauté sur lesquels ils ont une action lytique. Ce qu'il est intéressant de noter ici, c'est que lorsque la démonstration de la grande quantité de virus a été faite ainsi que celle de leur rôle potentiel, ceci a permis de comprendre pourquoi on n'expliquait pas ou mal jusqu'alors la régulation de certaines biomasses planctoniques à partir de l'analyse des facteurs ou processus bottom-up (nutriments, température) et top-down (prédation) classiques. Aujourd'hui, on peut citer 3 axes principaux de recherches sur le rôle fonctionnel des virus au sein des écosystèmes : (i) le premier consiste à évaluer la part de responsabilité des virus dans l'organisation des communautés planctoniques et plus spécifiquement dans la mortalité des communautés microbiennes (bactériennes, cyanobactériennes et algales) ; (ii) le second, à une échelle plus large, concerne l'estimation de la quantité de matière et d'énergie générée par l'activité virale et l'implication de ces phénomènes dans les cycles biogéochimiques ; (iii) le troisième concerne les aspects de la diversité phylogénétique, et notamment l'évaluation de l'impact des virus sur la diversité et la diversification des cellules hôtes, le rôle joué par les virus dans l'origine et l'évolution des génomes à ADN.

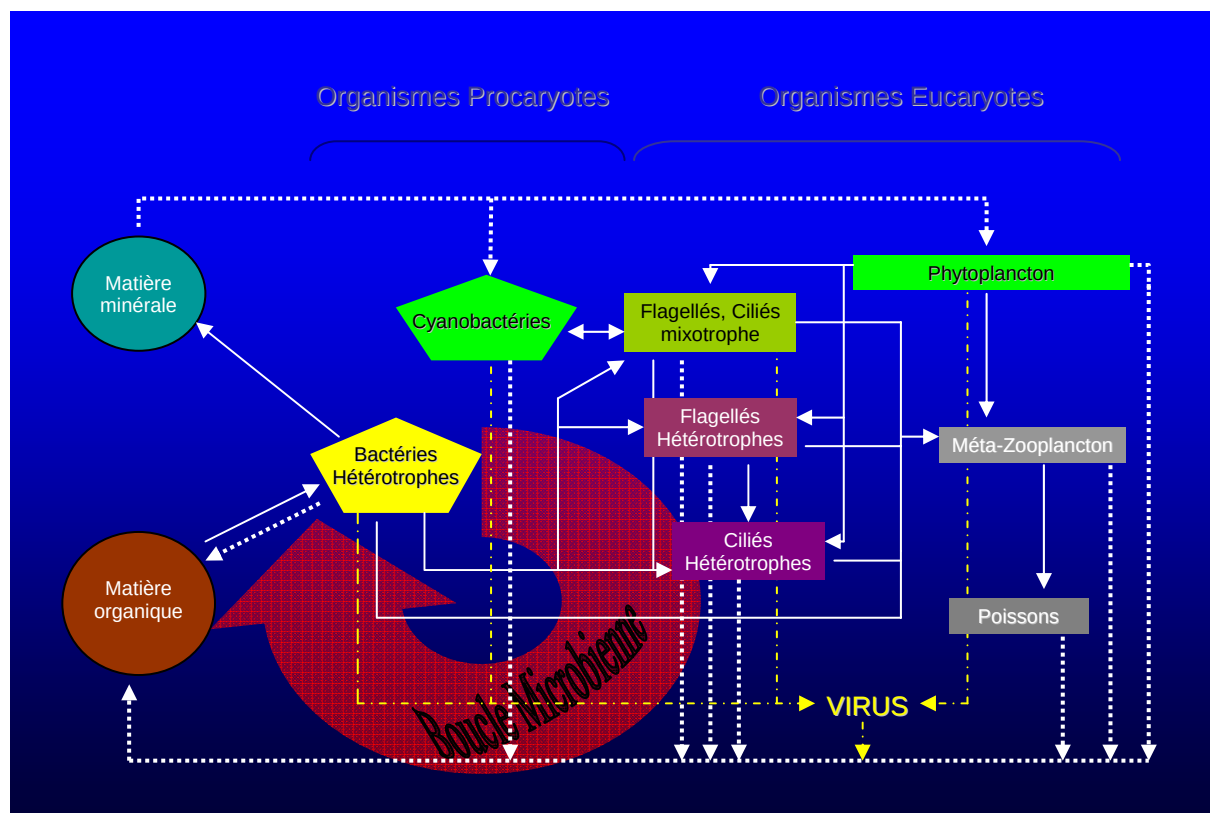


Figure I-4 : Les organismes photosynthétiques (en vert), fixent le dioxyde de carbone atmosphérique par photosynthèse (grâce à l'énergie solaire) et puisent dans l'eau les nutriments minéraux. La matière organique dissoute qu'ils libèrent dans le milieu est assimilée par les bactéries hétérotrophes. Les bactéries sont ensuite consommées par les flagellés et ciliés hétéro- et mixotrophes. On utilise le

terme de boucle microbienne pour qualifier la circulation de la matière organique via les bactéries hétérotrophes. Le métazooplancton (copépodes, rotifères, cladocères) est aussi un consommateur de bactéries, du phytoplancton, des flagellés et des ciliés. A chaque stade de cette chaîne trophique, des débris organiques et les nutriments minéraux sont relâchés dans l'eau (traits en pointillés). Les virus interviennent à la base de la chaîne trophique, en lysant les bactéries hétérotrophes, les cyanobactéries, et certains autres micro-organismes photosynthétiques. Ils contribuent à la redistribution de la matière organique dissoute.

I.5.b Les virus et les protistes hétérotrophes comme agents significatifs de la mortalité bactérienne

Les virus, les flagellés hétérotrophes et les ciliés sont considérés comme les principaux prédateurs des communautés bactériennes dans les écosystèmes aquatiques (Sanders *et al.* 1989, Simek *et al.* 1990, Kisand & Zingel 2000, Simek *et al.* 2003, Pradeep-Ram *et al.* 2005, Jacquet *et al.* 2005). Leurs rôles dans la mortalité bactérienne ont de très grandes conséquences sur le réseau trophique aquatique (voir chapitre I.4.c). Il est à noter que le zooplancton métazoaire peut également constituer un facteur de régulation plus important que les flagellés hétérotrophes (Langenheder & Jurgens 2001, Comte *et al.* 2006). Hofle *et al.* (1999) ont observé que, lors d'un événement saisonnier marqué comme celui de la phase d'eau claire, caractérisée par une forte prédation du zooplancton sur le phytoplancton, les cladocères pouvaient influencer aussi notablement la composition et réduire la diversité du bacterioplancton pélagique. Depuis Fuhrman & Noble (1995), on estime que la mortalité bactérienne engendrée par la lyse virale et le « broutage » par les flagellés hétérotrophes puissent être comparable et que ces deux processus représentent en fait les deux principales forces responsables de cette mortalité. L'importance relative de l'une et de l'autre semble néanmoins pouvoir varier très nettement dans le temps et l'espace et selon les différents écosystèmes (Weinbauer 2004, Pedros-Allio *et al.* 2000, Almeida *et al.* 2001, Guixa-Boixereu *et al.* 2001, Jacquet *et al.* 2005). La plus forte observation de prédominance de l'impact des virus par rapport à celle des prédateurs sur la mortalité bactérienne a été réalisée en environnement anoxique (Weinbauer & Hoffle 1998, Colombet *et al.* 2006), suggérant que les prédateurs sont en très faibles quantités et/ou ont des taux de broutage très faibles, ou encore en milieu hyper-salé où les taux de mortalité dues à la lyse virale sont bien supérieurs à ceux des prédateurs (Guixa-Boixerau *et al.* 1996). Il semblerait également que de faibles températures comme celles rencontrées en Antarctique réduiraient l'activité des flagellés hétérotrophes et favoriseraient l'activité virale (Guixa-Boixerau *et al.* 2001).

La vision dichotomique de la mortalité des bactéries engendrées soit par lyse virale soit par broutage protiste semble en fait très simpliste et les relations existant entre ces trois

compartiments sont sûrement beaucoup plus complexes (résumées et exposées par Jacquet *et al.* 2006). Les fortes interactions entre les virus et les prédateurs ont des conséquences directes ou indirectes sur la mortalité bactérienne. Une des interactions directes est la consommation des virus par les prédateurs entraînant une modification de la pression exercée par les virus et une modification du circuit du carbone dans les cycles biogéochimiques pour les bactéries (Suttle & Chen 1992, Gonzales *et al.* 1992, Gonzales & Suttle 1993, Bettarel *et al.* 2005). De manière moins directe, de nombreuses études ont prouvé que le « broutage » exercé par les prédateurs pourrait augmenter la lyse virale sur les bactéries (*e.g.* Jacquet *et al.* en révision). Pour exemple, Simek *et al.* (2001) et Weinbauer *et al.* 2007 ont émis l'hypothèse que le broutage des prédateurs, favorisant la production et l'activité des cellules (Sanders *et al.* 1992, Posch *et al.* 1999) par la libération de matières organique et inorganique, permettrait aux cellules : (i) d'avoir des taux de croissance beaucoup plus élevés (ii) et d'augmenter leur nombre de récepteurs membranaires. L'augmentation des récepteurs membranaires favoriserait la fixation des virus aux cellules et par conséquent augmenterait significativement les taux d'infection virale (Simek *et al.* 2001, Sime-Ngando & Pradeep Ram 2005). Une autre hypothèse a été proposée par Weinbauer *et al.* (2003, 2007) : le changement de diversité bactérienne engendré par le « broutage » des prédateurs favoriserait des espèces bactériennes capables de se répliquer rapidement, de résister au broutage, mais en revanche beaucoup moins résistantes à la lyse virale. Middelboe *et al.* (2001) ont également publié des résultats dans ce sens. Ces auteurs ont démontré que les cellules résistantes au broutage des protozoaires pourraient fournir un refuge pour les virus et être donc beaucoup plus assujetties à la lyse virale. Weinbauer *et al.* (2007) ont proposé d'appréhender les effets des virus et prédateurs non plus comme des effets additionnels sur les bactéries mais comme des effets antagonistes ou synergiques selon les différents prédateurs, proies, virus et hôtes présents. Il est à noter que l'hypothèse d'une activité virale augmentée par le broutage des prédateurs n'a pas toujours été confirmée (Hornak *et al.* 2005, Bongiorno *et al.* 2005).

I.5.c Rôle des virus dans les processus du réseau trophique et les cycles biogéochimiques

Les virus dans l'océan global représenteraient un total de 270 Mt de carbone soit $1/10^{\text{ième}}$ de la quantité de carbone imputable aux bactéries (Wilhelm & Suttle 1999) et 25 fois la quantité de carbone imputable aux protistes (Weinbauer & Herndl 2002). De par leur grande quantité de protéines (Hirayama *et al.* 1993) et d'ADN (Reisser *et al.* 1993,

Weinbauer *et al.* 1995), les virus contribuent significativement aux réservoirs de produits riches en éléments azotés, phosphorés et carbonés, potentiellement utilisables par les bactéries et le phytoplancton comme éléments nutritifs (Gobler *et al.* 1997, Noble *et al.* 1999). Cependant, compte tenu de leur petite taille, leur rôle comme élément de réserve est bien inférieur à leur rôle comme élément clef des cycles biogéochimiques (Weinbauer 2004). Quelques études ont pu mettre en évidence le rôle fondamental des virus dans le recyclage de la matière organique et les processus biogéochimiques. L'activité virale transforme indirectement le carbone particulaire en carbone dissous, court-circuitant ainsi le flux de carbone et de nutriments vers les consommateurs supérieurs, du réseau trophique aquatique. Pour illustrer ce concept, Wilhelm & Suttle (1999) ont démontré, en utilisant un modèle très simple, que 6 à 26% du carbone organique fixé par photosynthèse est recyclé en matière organique dissoute par la lyse virale. En lysant les microbes autotrophes et hétérotrophes, les phages modulent les flux de carbone et donc les cycles biogéochimiques au travers de la chaîne alimentaire (Fuhrman 1999). La composition chimique précise, la taille des molécules et la bio-réactivité des produits issus de la lyse virale sont encore très mal connues (Middelboe *et al.* 2006) bien que constituant une source significative de matière organique dissoute. Ces produits de lyse seraient utilisés par les bactéries hétérotrophes à un coût énergétique bien moindre que la matière organique de la colonne d'eau (Middelboe *et al.* 1996, Middelboe & Lyck 2002) et constitueraient, à terme, la source principale de carbone des bactéries (Wilhelm & Suttle 2000), notamment dans les zones où la présence de matières allochtones est très faible.

I.5.d Le transfert (horizontal) de gènes et les interactions reliant virus et diversité des procaryotes

Les virus peuvent jouer un rôle central dans le transfert de gènes entre microorganismes, à travers deux processus : la transformation et la transduction. Dans le premier cas, le virus induit le transfert génétique de façon indirecte en provoquant la libération de l'ADN de la cellule hôte lysée, pouvant être récupéré et utilisé par un autre microorganisme. Dans le second processus, plus direct et issu de la lysogénie, le virus incorpore une partie du matériel génétique de son hôte au sien puis l'injecte dans un nouvel hôte. La transduction est plus significative pour les phages lysogéniques que lytiques mais le phénomène existe pour les deux cycles, bien que l'étendue de ces mécanismes dans les systèmes aquatiques ne soit pas encore bien connue. Ces mécanismes peuvent toutefois avoir

un rôle important dans le maintien de la diversité génétique des populations, à travers l'homogénéisation des gènes dans une population hôte donnée mais également sur son évolution à plus grande échelle de temps (Ackermann 2001). Dans le transfert horizontal, les gènes sont transférés d'un organisme mature et indépendant, à un autre. Ce transfert est différent du transfert génétique vertical où les gènes « des parents » sont directement transmis à leur descendance. En 1997, Chiura a ainsi démontré l'existence de transferts d'ADN entre un bactériophage marin et une bactérie non marine (entérobactérie de type *Escherichia coli*), ces transferts pouvant atteindre jusqu'à $3,6 \times 10^{-3}$ événements par particule virale. De la même façon, Jiang & Paul (1998) ont rapporté des fréquences de transduction supérieures à $1,3 \times 10^{14}$ événements par an dans l'estuaire de Tampa Bay (Floride). Plus récemment, Clokie *et al.* (2003) ont pu démontrer pour la première fois que les phages infectant la souche marine *Synechococcus* pouvaient encapsider l'ADN de leur hôte (environ 8% du génome complet) avec une fréquence totale de 10^{-4} événement, fournissant de nouveau une évidence de l'importance potentielle des phages dans le transfert horizontal de gènes. C'est également le transfert de gènes qui serait à l'origine de certaines caractéristiques des cyanophages. En effet Mann *et al.* (2003) ont pu démontrer que certains cyanophages infectant *Synechococcus* ont intégré des gènes codants pour des composants clés de l'appareil photosynthétique. L'expression de ces protéines photosynthétiques issus du code génétique viral permet à la cellule hôte infectée de ne pas arrêter son activité de photosynthèse et donc de maintenir une source d'énergie pour les activités métaboliques. Weinbauer & Rassoulzadegan (2004) dans une revue bibliographique sur le sujet supportent l'hypothèse que l'activité virale participe à la variabilité génétique des procaryotes permettant ainsi leur évolution et brassage génétique mais également d'assurer un certain nombre de fonctions écologiques.

La diversité phénotypique et génotypique des populations de phages est directement liée à l'interaction entre les phages et leurs hôtes (Weinbauer 2004). Sans hôte, pas de parasite. Sans hôte avec ses particularités biochimiques, pas de virus spécifiques. Les scientifiques se servent de cette propriété d'interaction pour étudier l'influence des bactériophages sur la diversité du bactérioplancton. D'après le concept formulé par Thingstad & Lignell (1997), les virus tuent les microorganismes les plus compétitifs et peuvent donc garder le contrôle sur ces populations ou espèces dominantes. Ce concept baptisé « *killing the winner* » permet d'aider à la compréhension du paradoxe d'Hutchinson (Hutchinson 1961) sur le bacterioplancton et donc de répondre à la question : « Comment peut-on expliquer la présence d'autant d'espèces planctoniques dans un système où les ressources sont limitées et lorsque les théories compétitives prédisent une faible diversité ? ». La théorie du « *killing the*

winner » explique que lorsqu'un groupe bactérien devient dominant (*i.e.* important numériquement), la probabilité de rencontre avec son pathogène devient plus importante, et par conséquent la lyse virale s'exerce à une intensité plus forte sur cette population. Les virus infectent et lysent cette population majoritaire, les ressources nutritives deviennent alors disponibles aux groupes plus minoritaires. Ceci permet donc la co-existence de populations moins compétitives et minoritaires tout en assurant le maintien de la diversité bactérienne. Middelboe *et al.* (2001) ont montré expérimentalement que les phages se propagent en fonction de la densité en hôte et peuvent alors changer la composition clonale de l'hôte, par le biais notamment de mécanismes liés à la résistance. Un tel phénomène a également été identifié au cours de phases terminales d'efflorescences phytoplanctoniques (Tarutani *et al.* 2000, Jacquet *et al.* 2002, Tomaru *et al.* 2004). Dans les eaux douces, Weinbauer & Hofle (1998) ont montré que l'incubation d'un échantillon rempli de bactéries avec ou sans les virus du même milieu se traduisait par des changements dans les abondances, les taux de croissance et la diversité bactérienne. Ce type de résultats lié à l'ajout de virus dans un échantillon a été trouvé par de nombreux autres auteurs (Suttle 1992, Peduzzi & Weinbauer 1993), supportant très largement le concept de « *killing the winner* ». Si ce concept est donc largement accepté par la communauté scientifique depuis 10 ans, il est aussi parfois critiqué et/ou modifié. Tout d'abord, on peut le compléter par un effet indirect (*i.e.* par la matière organique) du contrôle de la diversité bactérienne par les virus. Il est possible qu'un événement de lyse massif d'une communauté phytoplanctonique ou bactérienne se traduise par une libération de matière organique dont la biodisponibilité profite à la communauté bactérienne dont la structure pourrait être modifiée de manière notable (Van Hannen *et al.* 1999). Les changements de la composition de la matière organique dissoute sont en effet connus pour induire des changements de la communauté bactérienne (Lebaron *et al.* 1999, Riemann *et al.* 2000). En manipulant les concentrations virales et en analysant la diversité bactérienne, Schwalbach *et al.* (2004) ont suggéré que (i) les virus et les cellules hôtes (bactéries) ont une coexistence beaucoup plus stable que ce qui est proposé par la théorie du « *killing the winner* » (ii) les virus ne semblent pas avoir un contrôle constant dans le temps sur la diversité bactérienne. Bouvier & del Giorgio (2007) ont proposé un scénario plus complexe, dans lequel les espèces bactériennes dominantes auraient une susceptibilité plus faible à la lyse virale grâce au développement de résistances ou de propriétés métaboliques intrinsèques. Les groupes bactériens indétectables ou numériquement peu importants seraient donc plus susceptibles aux infections virales et plus efficaces dans l'exploitation des ressources, suggérant que la mortalité sélective jouerait un rôle clef dans la composition de la structure de la communauté

bactérienne. Sans remettre en cause la théorie du « *killing the winner* », on voit que celle-ci peut donc revêtir de nombreux aspects.

I.6 Objectifs et questions posées au cours de ce travail de thèse

Ce travail s'inscrit dans une problématique générale d'étude de la structure et du fonctionnement des réseaux trophiques pélagiques en milieu lacustre. La connaissance de la dynamique des communautés microbiennes, de leurs facteurs de régulation, et des modalités de transfert de la matière au sein des réseaux trophiques est indispensable à la compréhension du fonctionnement des écosystèmes et de leur évolution face aux changements environnementaux locaux (pollution, eutrophisation, invasion biologique, etc.) ou plus globaux (hausse des températures, accroissement du rayonnement ultraviolet, impact des molécules xénobiotiques, etc...). L'une des étapes clés pour progresser dans cette connaissance est l'acquisition de données concernant la dynamique des communautés planctoniques pouvant être reliée à l'évolution des diverses variables d'état caractérisant les systèmes limniques. Si les communautés phytoplanctoniques et zooplanctoniques ont bénéficié des nombreux efforts de suivis pour acquérir des séries chronologiques concernant leur évolution spatio-temporelle notamment au sein des lacs péri-alpins, il n'en est pas de même pour les communautés microbiennes. Les bases de données disponibles à l'heure actuelle sont rares voire inexistantes pour les communautés bactériennes, les communautés picoplanctoniques dans leur ensemble et les communautés virales en particulier.

Dans le cadre de ce travail de thèse, notre intérêt s'est porté plus spécifiquement sur la communauté virale pour laquelle les données sont encore très fragmentées en milieu lacustre. Cette remarque était particulièrement vraie au début de ce travail de recherche puisqu'aucune donnée n'existait alors sur ce compartiment pour les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget. L'étude de la dynamique virale a été complétée par l'analyse de la dynamique de l'ensemble des communautés de la boucle microbienne (bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries, petits eucaryotes autotrophes, protistes flagellés et ciliés). Nous avons posé un certain nombre de questions à la fois descriptives et fonctionnelles et qui ont nécessité l'utilisation du couplage d'approches écosystémiques (suivis *in situ* des communautés virales et microbiennes réalisés pour les 3 lacs à mettre en relation avec les principales variables environnementales disponibles) et expérimentales en microcosmes. Ces questions peuvent être résumées comme suit :

(1) Quelles sont les abondances et la distribution des communautés virales dans les lacs péri-alpins en zone pélagique ?

(2) Comment les abondances des communautés microbiennes varient-elle dans le temps et l'espace, compte-tenu du statut trophique des écosystèmes et du contexte environnemental ?

(3) Existe-t-il une dynamique saisonnière reproductible au sein de chaque écosystème situé dans une même éco-région ?

(4) Quels sont les liens existant entre les communautés caractéristiques de la boucle microbienne et les paramètres environnementaux ?

(5) Est-il possible d'estimer le rôle des virus comme agents de mortalité des communautés et plus particulièrement des bactéries hétérotrophes (sachant que 75 à 90% des virus seraient des bacteriophages) et ce comparativement à la prédation des flagellés ?

(6) Peut-on observer l'impact des virus et/ou prédateurs protistes sur la diversité bactérienne et ses modifications ?

Ces grandes questions auxquelles nous avons tenté de répondre avaient donc pour objectif:

- d'étudier finement la dynamique des principales communautés microbiennes dans les trois plus grands lacs naturels français et d'Europe occidentale ;
- d'estimer l'impact des virus en tant qu'agents de mortalité cellulaire et régulateurs de diversité bactérienne.

CHAPITRE II

Sites d'étude

CHAPITRE II : Sites d'étude

II.1 Présentation des sites d'étude

L'étude proposée dans ce document a été réalisée sur les communautés microbiennes des trois lacs péri-alpins : le Léman, les lacs du Bourget et d'Annecy localisés dans les départements de Savoie et Haute-Savoie.

Ces trois lacs de la région Rhône-Alpes, d'origine glaciaire, possèdent des caractéristiques géologiques et physiques assez similaires (Tableau II-1). Ils sont caractérisés par une profondeur et une taille importantes qui leur confèrent certaines propriétés physiques cruciales pour la dynamique générale du système dont la monomicticité (Pourriot & Meybeck 1995). La zone pélagique est dominante, le volume disponible permet une grande hétérogénéité des habitats, des masses d'eau, une stratification thermique et un renouvellement total ou partiel des eaux de fond. Les trois lacs possèdent des caractéristiques chimiques différentes leur conférant des statuts trophiques différents avec pour conséquences des fonctionnements écologiques différents. Le lac d'Annecy est qualifié d'oligotrophe alors que les lacs Léman et du Bourget sont qualifiés de mésotrophes (Anneville 2001, Domaizon *et al.* 2003, Jacquet *et al.* 2005).

Tableau II-1 : Caractéristiques principales des trois lacs péri-alpins.

Caractéristiques	Unités		Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
Altitude	(m)		372	232	447
Profondeur	(m)	Max	310	147	65
		Moy.	172	81	41,5
Volume	(Km ³)		89	3,5	1,1
Aire	(Km ²)		585	45	28
Temps renouvellement des eaux	(années)		11	10	3,8
Type de mélange des eaux			Mono-Méromictique	Mono-Méromictique	Monomictique
Statut trophique			Mésotrophe	Mésotrophe	Oligotrophe

II.1.a Le (lac) Léman

Le Léman (46°22N', 06°28'E) est un lac en forme de croissant et occupe une cuvette creusée dans le bassin molassique (Wildi & Pugin 1998). Son nom est très ancien puisque Jules César, de passage à Genève en 58 avant JC l'utilise déjà (Spon 1680). Même si au cours des siècles, il fut le lac de Lausanne puis le lac de Genève, sa dénomination officielle est : Le

Léman en France et «Lake Geneva » pour les anglosaxons. Il constitue une frontière naturelle entre la France et la Suisse, la partie nord du lac (2/3) se trouvant en territoire helvétique et la partie sud (1/3) en territoire français. Le Léman est un lac de type monomictique chaud, compartimenté en deux bassins très distincts appelés le « Grand-Lac » ou « lac supérieur » qui est large et profond et le « Petit-Lac » ou « lac inférieur » qui est allongé et peu profond (Fig. II-1). Il est fréquent que le brassage des eaux profondes du Grand-Lac avec les eaux de surface ne soit pas assuré lors d'hivers aux températures trop douces, d'où un statut méromictique (CIPEL 1997). Depuis 1884, le niveau du lac est régulé artificiellement à l'altitude de 372,05 m et son amplitude annuelle (marnage) est de 60 à 80 cm. Les apports sédimentaires et hydrologiques actuels du Grand-Lac proviennent à 80% du Rhône et de la Dranse (Meybeck 1970) dont les régimes d'écoulement (glacio-nival alpin et nival alpin) et les sédiments transportés ont une signature alpine et pré-alpine. Le Léman est considéré comme le plus grand lac naturel d'Europe occidentale par sa superficie et sa profondeur. La qualité des eaux du Léman est suivie en continu depuis 1960, sous l'égide de la CIPEL (Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman contre la pollution). Oligotrophe avant 1960, le Léman est devenu eutrophe dans les années 1970-80 pour retrouver actuellement un statut mésotrophe (Anneville 2001).

II.1.b Le lac du Bourget

Le lac du Bourget (45°48'N, 05°49'E) de forme rectangulaire et allongé, est considéré comme le plus grand lac naturel entièrement français. Il constitue un élément important du patrimoine naturel français par son intérêt écologique : pour l'ichtyofaune (lac intermédiaire entre plaine et montagne), l'avifaune (zone d'hivernage de nombreuses espèces), les associations végétales (microclimat). Il est alimenté par la Leysse, le Sierroz, et le Tillet, et se déverse dans le Rhône, au nord, par le canal de Savières. Le lac du Bourget a été atteint par l'eutrophisation dans les années 1970. En 1980, un ceinturage des effluents des agglomérations du sud du lac a été réalisé. A la suite de ces travaux, les apports en phosphore ont diminué radicalement en 1980, de 50% pour le phosphore total et de pratiquement 80% pour les orthophosphates. Suite aux mesures prises pour contrôler ces apports, la qualité chimique des eaux s'est améliorée, mais le fonctionnement écologique reste encore très perturbé, de part l'existence de proliférations de micro algues et en particulier d'une cyanobactérie filamenteuse toxique (Jacquet *et al.* 2005). Depuis 1998, les suivis biologiques ont en effet révélé une prolifération importante de *Planktothrix rubescens* qui pose des

problèmes aux gestionnaires du lac (Humbert & Le Berre 2001, Briand *et al.* 2005, Jacquet *et al.* 2005). Il est actuellement considéré comme un lac mésotrophe (CISALB 2006).

II.1.c Le lac d'Annecy

Le lac d'Annecy (45°54'N, 06°07'E) est en forme d'auge. Il est constitué du « grand lac » au nord et du « petit lac » au sud. Il est considéré comme le deuxième plus grand lac naturel entièrement français par sa superficie (Tableau II-1), après le lac du Bourget. Le lac d'Annecy est un lac oligotrophe (Tableau II-1), qui a été rapidement protégé des apports d'eaux résiduaires par un égout collecteur périphérique recueillant les réseaux secondaires et dont la construction a débuté en 1961 (Dussart 1963). A l'initiative du SILA et maintenant du SMLA (Syndicat Mixte du Lac d'Annecy), la qualité de l'eau du lac a été suivie en continu de 1964 à 1980 puis de 1987 à nos jours par la Station d'Hydrobiologie Lacustre INRA de Thonon les Bains.

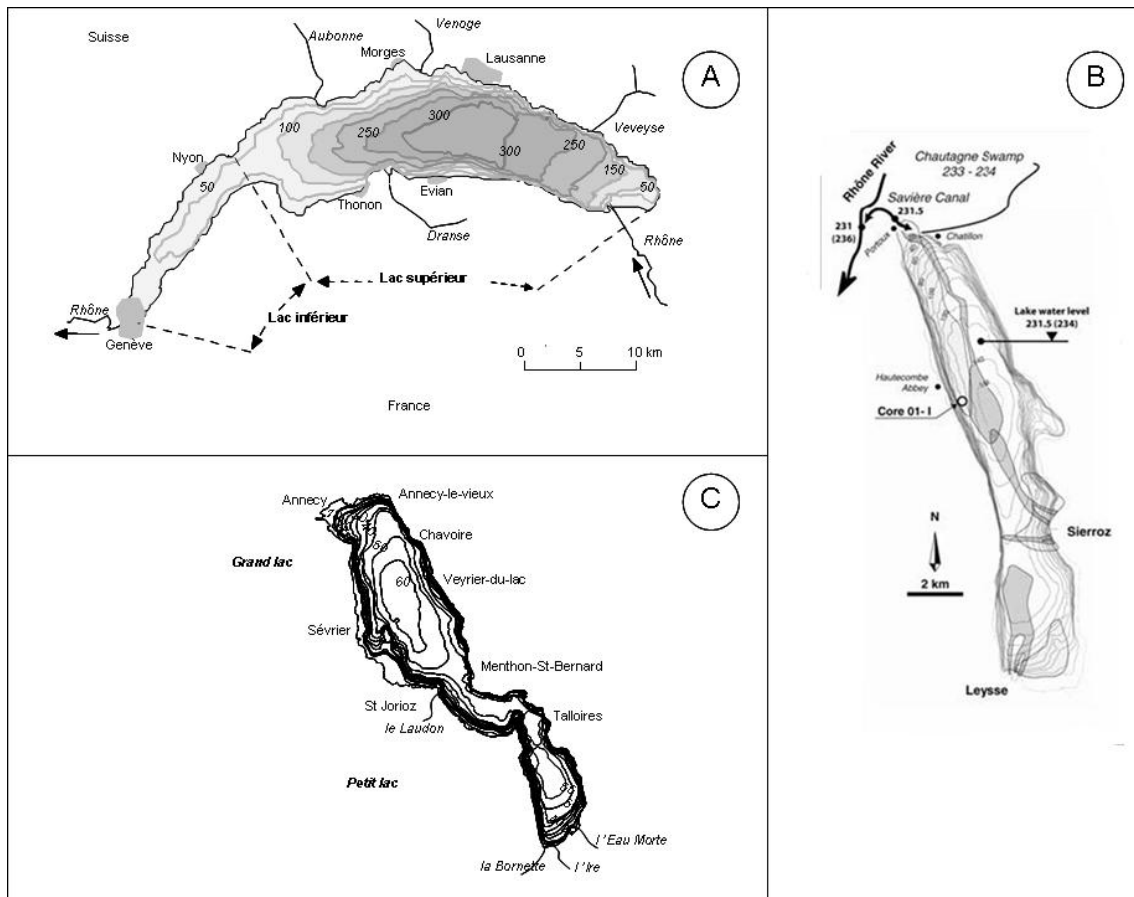


Figure II-1 : Cartes bathymétriques des lacs Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C).

II.2 Intérêts des 3 sites d'étude

Les trois écosystèmes précités, comme la plupart des lacs situés dans les zones à fort développement économique, ont subi à partir des années 1960 des pollutions multiples. La pollution par le phosphore y tient une place prépondérante, responsable de l'accélération de l'eutrophisation des lacs (Vollenweider 1968, 1975). Les nuisances associées sont celles d'une pollution organique (proliférations phytoplanctoniques doublées parfois de contaminations du milieu par des toxines cyanobactériennes). La lente prise de conscience des problèmes environnementaux, de la nécessaire protection des milieux et de la biodiversité, du caractère limité des ressources en eaux et du rôle économique croissant des lacs, ont aboutit dans les années 1970/80, à l'adoption, de mesures de correction de l'eutrophisation (Barroin 2001, Dorioz & Blanc 2001). Les Lacs Léman et du Bourget sont actuellement des lacs en cours de restauration et considérés à l'état actuel comme mésotrophes, après avoir été largement eutrophisés dans les années 1970. Le lac d'Annecy a quant à lui été préservé de l'eutrophisation (voir chapitre II.1) et a conservé un état oligotrophe. La pollution par les xénobiotiques et le réchauffement des eaux viennent également accroître la complexité du fonctionnement, en perturbant potentiellement les relations entre biodiversité et dynamique des communautés. Les trois lacs offrent des situations différentes en terme de qualité des eaux et d'état de l'écosystème, en dépit de leur proximité géographique et la parenté de leurs environnements physiques et humains (Cristofini *et al.* 1994). Il s'agit de lacs dont les bassins sont de longue date anthropisés et qui sont soumis actuellement à un double mouvement de pressions anthropiques : i) baisse progressive de la charge externe en nutriments (réoligotrophisation pour le Léman et le lac du Bourget), ii) accentuation d'autres pressions locales (urbanisation) et globales (réchauffement des eaux). Les débats sociétaux émergeant interrogent les connaissances et modèles des scientifiques sur la dynamique globale et la gestion de ces systèmes complexes. Les questions relatives à la qualité des eaux et les conséquences du réchauffement climatique sont devenues deux axes majeurs des recherches menées sur les trois lacs péri-alpins. Actuellement, faute de connaissances suffisantes sur les dynamiques et processus clés, les réponses à ces questions restent fragmentaires (Gillet & Quetin 2006, Molinero *et al.* 2006). Outre ces questions sur la qualité de l'eau et aux conséquences du réchauffement climatique, les lacs péri-alpins représentent des modèles pertinents pour aborder certaines des grandes questions de l'écologie, notamment les questions relatives aux cycles biogéochimiques, à la biodiversité et à son rôle fonctionnel.

L'ensemble de ces questions sont actuellement centrales dans les axes de recherche développées au sein de l'UMR CARTEL (Unité Mixte de Recherche INRA –Université de Savoie, Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques des Ecosystèmes Limniques), et, les expériences menées en complément des suivis limnologiques assurés à la station INRA de Thonon-les-bains constituent un cadre dans lequel s'intègre ce travail de thèse. En effet, la qualité des eaux, la biologie et l'écologie des trois grands lacs naturels (Annecy, Bourget, Léman) sont aujourd'hui au centre du projet de création d'Observatoire de Recherche en Environnement, l'ORE LACS, porté par l'INRA.

CHAPITRE III

Approches et méthodologies

CHAPITRE III : Approches et méthodologies

Dans le cadre de ce travail de thèse, deux approches parallèles et complémentaires ont été utilisées. La 1^{ère} approche, dite écosystémique, a été basée sur un suivi de la dynamique des communautés microbiennes des trois lacs péri-alpins, permettant de visualiser l'évolution dans le temps et l'espace (profondeurs) des abondances des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries, des petits eucaryotes hétérotrophes/autotrophes et des virus. Parallèlement au suivi de ces communautés, les caractéristiques physico-chimiques ont été mesurées dans le cadre des suivis de la qualité des eaux de ces lacs ; les liens entre dynamique des communautés et évolution des paramètres environnementaux permettant de mettre en évidence des facteurs de régulation potentiels de ces communautés.

La 2^{nde} approche mise en œuvre a été de type expérimental afin d'explorer le rôle des virus et des prédateurs (flagellés hétérotrophes essentiellement) en tant qu'agents de mortalité des bactéries hétérotrophes et autotrophes, à différentes périodes de l'année. Dix neuf expériences *in situ* en microcosmes, utilisant une technique de dilution ont été réalisées dans les trois lacs. La technique de dilution (voir chapitre III.2) a consisté à incuber les communautés microbiennes dans différentes enceintes expérimentales dans lesquelles la présence des prédateurs et des virus était manipulée. Deux types de diluants ont été utilisés afin de diminuer graduellement l'impact des prédateurs seuls ou avec les virus pour mesurer l'importance relative des uns et des autres sur la mortalité des bactéries hétérotrophes et des picocyanobactéries. Une série d'expériences (consistant à fractionner en taille les communautés et à enrichir certaines enceintes d'incubation en particules virales) a aussi été menée pour tenter d'apprécier au Léman l'impact des virus sur les modifications de diversité bactérienne. Ce travail est en cours d'exploitation et nous nous contenterons d'évoquer les principaux résultats exploités à ce jour.

III.1 L'approche écosystémique

Le suivi des communautés microbiennes a été réalisé dans les trois lacs péri-alpins de 2003 à 2006 inclus. Pour ces trois lacs, en 2003, aucune donnée sur la communauté virale n'était encore disponible. Cette remarque est également vraie pour les picocyanobactéries et seulement quelques données fragmentaires existaient pour les bactéries hétérotrophes et les protozoaires jusqu'alors. De plus, aucune comparaison des dynamiques microbiennes saisonnières n'avait encore été rapportée pour ces 3 lacs.

Une stratégie d'échantillonnage légèrement différente existe suivant les lacs, liée aux choix opérés dans le cadre des suivis à long terme des paramètres physico chimiques et biologiques par les différents comités scientifiques gestionnaires des lacs. Ainsi, les prélèvements ont été réalisés aux profondeurs de 2,5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30 et 50 mètres pour le Léman ; de 2, 6, 10, 15, 20, 30 et 50 mètres pour le lac du Bourget et de 3, 10, 15, 20, 25, 30 et 45 mètres pour le lac d'Annecy. Un échantillonnage bi-mensuel a été privilégié durant les mois de mars à novembre inclus afin de couvrir les périodes de reprise ou de forte activité biologique, de stratification et de déstratification thermique... (voir chapitre IV.2). L'effort a souvent été réduit à une seule campagne d'échantillonnage pendant la période hivernale (de décembre à février). Les échantillons d'eau récoltés lors de ces campagnes ont permis de dénombrer les communautés microbiennes mais également d'effectuer les mesures de la composition chimique de l'eau. Les prélèvements et les mesures des paramètres physiques ont été réalisés à la station de référence de chaque écosystème, localisée à la verticale de la plus grande profondeur du Lac (Tableau II-1). Différentes techniques ont été utilisées pour mesurer les paramètres physiques et chimiques et pour dénombrer les communautés microbiennes. L'utilisation de la cytométrie en flux (CFM) nous a permis de réaliser le dénombrement des communautés (virus, bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries et petits eucaryotes autotrophes). Les protistes flagellés ont été dénombrés par microscopie à épifluorescence (MEF). La mesure des éléments nutritifs : l'azote ammoniacal (N-NH_4), l'azote nitrique (N-NO_3), les ortho phosphates (P-PO_4) et la silice réactive (SiO_2), a été effectuée par le laboratoire de chimie de l'INRA de Thonon-les-Bains selon les protocoles standardisés dans le cadre des Normes AFNOR (informations disponibles sur le site web : <http://www.thonon-inra-chimie.net>). La température ($^{\circ}\text{C}$), l'oxygène dissous (mg.l^{-1}) et la concentration en chlorophylle *a* (mg.m^{-3}) ont été déterminés à l'aide de deux sondes multiparamétriques, la sonde CTP 90 « Sea & Sun Technology » 24610 pour les lacs Léman et d'Annecy et la sonde CTD 19 « Seacat profiler Seabird » dans le lac du Bourget, chacune munie d'un capteur de mesure de fluorescence de la chlorophylle *a*. Les deux sondes ont été inter-calibrées tous les ans. La transparence de chaque lac a été mesurée à l'aide d'un disque de Secchi de 25 cm de diamètre.

III.2 L'approche expérimentale *in situ* : La méthode de dilution

La méthode de dilution de Landry & Hassett (1982) a été initialement élaborée pour étudier et mesurer l'impact de la prédation du micro-zooplancton sur le phytoplancton. Cette

technique a été largement améliorée et discutée au cours du temps (Burkill *et al.* 1987, Paranjape 1987, Gifford 1988, Gallegos 1989, Andersen *et al.* 1991, Landry *et al.* 1995, Dolan *et al.* 2000, Worden & Binder 2003, Agis *et al.* 2007) pour devenir une technique de référence et être utilisée avec des proies et des prédateurs planctoniques caractérisés par tout type de taille (Reckermann & Veldhuis 1997, Kuipers & Witte 2000, Worden & Binder 2003, Troussellier *et al.* 2005, Yokokawa & Nagata 2005). Elle a été très récemment détournée de son utilisation première par Evans *et al.* (2003), pour étudier conjointement l'impact des virus et des prédateurs sur une espèce phytoplanctonique très ubiquiste, *Micromonas pusilla*, puis par Baudoux *et al.* (2006) pour étudier l'impact des virus sur une autre espèce phytoplanctonique, responsable d'efflorescence, *Phaeocystis globosa*. Nous pouvons dire ici que nous avons appliqué cette technique pour la première fois au compartiment bactérien (voir Jacquet *et al.* 2005). Elle nous a permis d'attribuer des valeurs chiffrées (en %) de la part relative des prédateurs mais également des virus dans la mortalité des communautés procaryotiques du plancton pour les trois lacs péri-alpins.

III.2.a Principe de la méthode

La technique de dilution a reposé sur l'incubation d'un échantillon du lac ayant subi différents niveaux de dilution au moyen de deux « types » de diluant utilisé en parallèle, cette « double » dilution graduelle des virus et des virus+prédateurs permettant d'estimer l'impact des virus et/ou des prédateurs sur les taux de croissance des communautés microbiennes. Dans le cadre de nos travaux, l'eau du lac a tout d'abord été filtrée à travers une maille de porosité de 11 μm afin d'éliminer les prédateurs supérieurs et ceci a constitué notre échantillon de référence pour ne s'intéresser qu'aux compartiments biologiques suivants : les virus, les bactéries et les protistes flagellés. L'eau brute filtrée à travers 11 μm et non diluée constituait l'échantillon nommé 100%. Les différentes enceintes étaient alors constituées de cette eau filtrée mais diluée à 70%, 40%, et 20% avec de l'eau (du lac) filtrée soit à travers 0,2 μm soit à travers 0,02 μm (en fait 30 KDa). Ces deux séries de dilution, opérées parallèlement, devaient permettre en théorie de réduire la quantité de prédateurs flagellés (diluant 0,2 μm) ou celle des prédateurs + virus (diluant 0,02 μm). En diminuant graduellement la pression exercée par les prédateurs ou par les prédateurs et les virus, il était attendu que les taux de croissance de chaque communauté (bactéries, picocyanobactéries et petits eucaryotes) changent et augmentent de manière significative. Le jeu de données généré devait donc permettre d'établir une régression linéaire entre taux de croissance et dilution,

plus la dilution étant importante plus le taux de croissance de la communauté étudiée étant supposé important en réponse à l'absence de mortalité induite par les micro-organismes prédateurs et/ou parasites (Fig. III-1). De cette régression, on devait pouvoir utiliser le coefficient de régression pour calculer la part de mortalité imputable aux prédateurs ou aux prédateurs et virus à partir de la formule de Suzuki *et al.* 2002 : $Y = [1 - \exp(-a)] \times 100$; Y : % de mortalité expliqué ; a : Coefficient de régression. Avant utilisation, tous les coefficients de régression ont été testés statistiquement, par un test de régression linéaire (avec une valeur de $p < 0.1$).

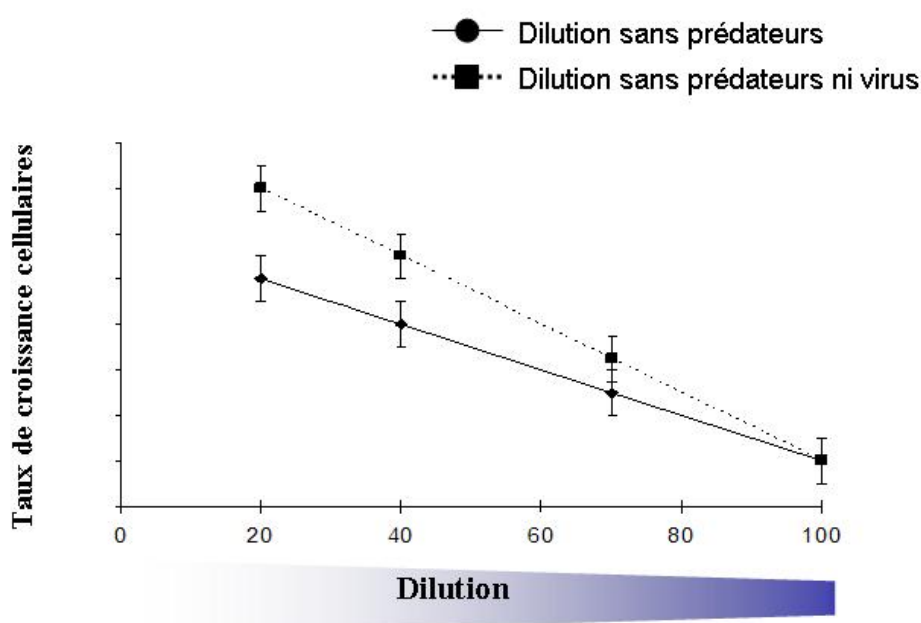


Figure III-1 : Représentation graphique des résultats attendus. Deux diluants sont utilisés : sans prédateurs brouteurs et sans brouteurs ni virus ; et trois niveaux de dilution 20%, 40%, 70%. Le 100% est composé d'eau du lac non dilué.

III.2.b Description des expériences conduites

Les expériences de dilution ont été répétées 19 fois au total dans les trois lacs durant les années 2003 à 2006. Elles ont été réalisées à trois reprises dans le lac du Bourget en 2003, à 2 reprises dans le Léman en 2004 et enfin de 4 à 5 fois de 2005 à 2006 dans les trois lacs (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Dates des différentes expériences de dilution conduites dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

	Saison	Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
2003	Printemps	X	31 mars. - 04 avril	X
	Printemps	X	19 - 23 mai	X
	Eté	X	18 - 22 août	X
2004	Printemps	31 mars - 09 avril	X	X
	Printemps	11 - 18 mai	X	X
2005-2006	Automne	28 - 30 septembre	04 - 06 octobre	12 - 14 octobre
	Hiver	18 - 20 janvier	25 - 27 janvier	31 janvier. - 02 février
	Printemps	21 - 23 mars	05 - 07 avril	11 - 13 avril
	Printemps	10 - 12 mai	X	17 - 19 mai
	Eté	19 - 21 juillet	27 - 29 juillet	01 - 03 août

La description présentée dans ce chapitre est celle des 14 expériences réalisées en 2005-2006. Les variations méthodologiques des 5 expériences de l'année 2003 et 2004 sont reportées dans le chapitre V.

Chaque expérience débuta par le prélèvement d'eau aux stations de référence des trois lacs (Tableau II-1). L'eau récoltée par un système de pompe depuis le bateau a permis de réaliser un prélèvement intégré sur la strate 0-10 mètres correspondant à la zone épilimnique en période stratifiée. Nous savons, sur la base de travaux précédents (Comte *et al.* 2006) et sur la base des données de suivis d'abondance et diversité des communautés microbiennes (Dorigo 2005) que cette strate présente une bonne homogénéité dans sa composition (microorganismes et paramètres physico-chimiques) et que des échantillons intégrés sur cette couche d'eau sont pertinents dans la cadre de comparaisons saisonnières.



Figure III-2 : Photographies de la mise en place de l'expérience de dilution : le système d'ultrafiltration utilisé (A), les microcosmes *in situ*, Bouteilles Nalgene (0,5 litres) hermétiques (B), les microcosmes *in situ* incubés à 1 mètre de profondeur dans le lac (C), le site d'incubation des microcosmes *in situ*, Port semi fermé de la station INRA d'hydrobiologie lacustre de Thonon les bains (D).

L'eau récoltée (environ 15 litres) a ensuite été transportée au laboratoire afin d'y être filtrée et préparée. Les filtrations successives sur 20 μm , 11 μm (maille filtrante NYCOM, Buisine, France) ont été réalisées afin d'éliminer le métazooplancton et les organismes ciliés. L'eau a ensuite été filtrée à travers 2 μm et sur 0,2 μm (filtres Nuclepore, Whatman) afin de préparer le diluant sans prédateurs. Le diluant sans prédateurs ni virus a été préparé, à partir d'eau préalablement filtrée sur 0,2 μm , par ultrafiltration tangentielle (Fig. III-2) au moyen d'une cassette ultrafiltrante (rattachée à une pompe péristaltique) contenant une membrane de porosité 30 KDa (Vivaflow, Vivasciences). Le diluant ainsi obtenu est qualifié de diluant 0,02 μm . Les deux diluants, sans prédateurs et sans prédateurs ni virus, ont alors été mélangés avec l'échantillon filtré sur 11 μm afin d'obtenir, dans les différentes enceintes expérimentales, des gammes de dilutions de 70, 40 et 20 %. Les gammes de dilution ont été réalisées en duplicat. Deux enceintes expérimentales contenant uniquement du diluant sans prédateurs et sans prédateurs ni virus ont également été préparées afin de confirmer l'absence de contaminations. Le dispositif expérimental était composé au total de 16 enceintes. Les enceintes expérimentales, des bouteilles en polycarbonate de 500 ml (*Nalgene*, *Bioblock*) ont été préalablement nettoyées à l'acide, puis rincées trois fois avec de l'eau MilliQ et enfin autoclavées. Une fois préparées, les enceintes expérimentales ont été mises à incuber à une profondeur d'1 mètre pendant 48 heures dans le Léman (Fig. III-2). Les mesures d'abondance des bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries, petits eucaryotes autotrophes et des virus en cytométrie en flux ont été effectuées tous les jours (T0, T24h, T48h) dans l'ensemble des enceintes. Le dénombrement des protistes hétérotrophes et pigmentés a été réalisé en début et fin d'expériences afin de vérifier la gamme de dilution réalisée et d'éventuelles "contaminations" par des protistes de taille supérieure à la limite fixée.

III.3. Autre approche expérimentale menée au Léman : La méthode de fractionnement et d'enrichissement en particules virales

III.3.a Principe et objectifs de la méthode

Une autre méthode expérimentale en microcosmes *in situ* a été élaborée afin d'analyser la dynamique et la diversité des communautés microbiennes sur une courte durée de temps et en système contrôlé. L'objectif principal était ici de décrire les régulations potentielles entre les communautés, à partir du fractionnement de ces dernières par classe de taille (comme fait lors des expériences de dilution), mais surtout d'étudier le rôle potentiel des

virus sur la diversité des bactéries hétérotrophes. Pour cela, en plus du fractionnement, certaines enceintes étaient enrichies en particules virales pour accroître la probabilité de rencontre entre virus et bactéries et pour stimuler la potentialité des virus comme agents de mortalité mais aussi de contrôle de la diversité. Ces expériences d'enrichissement/fractionnement ont été effectuées 2 fois au cours du printemps 2004, dans le lac Léman, en couvrant 2 états du lac: (i) non stratifié du 05 au 13 avril 2004, (ii) stratifié du 10 au 18 mai 2004. Ces expériences ont eu pour modèle les expériences de Noble *et al.* (1999) portant sur l'effet de l'enrichissement en virus sur la mortalité et la croissance du bactérioplancton hétérotrophe.

III.3.b Description des expériences conduites

L'eau récoltée, servant aux différentes filtrations, a consisté en un prélèvement intégré entre 0 et 10 mètres au milieu du lac, correspondant à l'épilimnion en période stratifiée, un protocole comparable à ce que nous avons fait pour les expériences de dilution. Deux types de filtration ont également été opérées : une double filtration à travers 2 μm pour ne conserver dans l'échantillon que les virus et les bactéries (sans prédateurs) et une filtration préalable à travers de la maille 10 μm pour conserver virus, bactéries, pico- et nanoflagellés. Les échantillons filtrés ($<2 \mu\text{m}$, $<10 \mu\text{m}$) non enrichis en particules virales ont été placés dans des bouteilles nommées « contrôle ». Les échantillons filtrés ($<2 \mu\text{m}$, $<10 \mu\text{m}$) enrichis en virus ont été placés dans les bouteilles « enrichissement », comme indiqué Fig. III-3. La solution de virus concentrés servant à enrichir ces bouteilles a été obtenue par une succession de filtrations sur 10, 2 et 0,2 μm (filtres nucléopores) puis par ultra-filtration tangentielle avec une mini-cassette (Vivaflow-Vivasciences) de porosité 30 KDa. Les bouteilles utilisées ont été des bouteilles Nalgene hermétiques de 2,5 litres. Elles ont été incubées pendant 96 heures à 1 mètre de profondeur dans le Port semi fermé de la station INRA d'hydrobiologie lacustre de Thonon les bains.

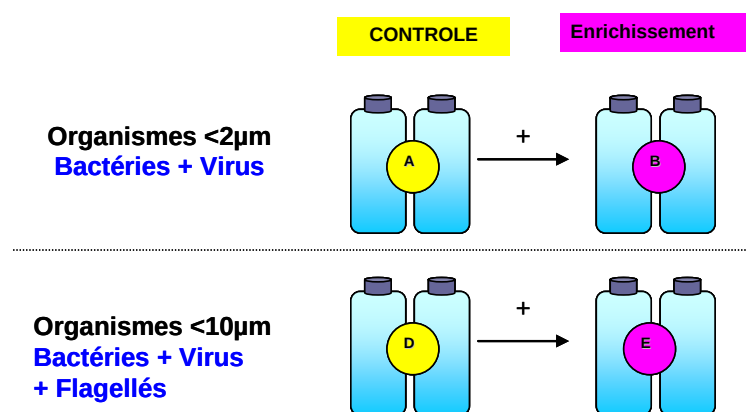


Figure III-3 : Figure illustrant les traitements considérés lors de l'expérience d'enrichissement menée au Léman.

Les mesures d'abondance des bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries, petits eucaryotes autotrophes et des virus en cytométrie en flux ont été effectuées toutes les 24h entre T0 et T96h dans l'ensemble des enceintes. Toutefois nous ne présenterons ici que les évolutions observées entre 0h et 96h, temps d'incubation pour lequel nous avons choisi d'explorer les effets sur la diversité bactérienne. Le dénombrement des protistes hétérotrophes et potentiellement mixotrophes a été réalisé à T0, T96h dans les enceintes <10 µm. Un comptage a également été réalisé dans quelques enceintes <2 µm, afin d'évaluer l'éventuelle "contamination" par des des petits flagellés. Les prélèvements pour la diversité bactérienne ont été réalisés à T0 et T96 dans l'ensemble des enceintes. Ces prélèvements après extraction et PCR ont été analysés par DGGE (Annexe V). Le broutage, exercé par les protistes hétérotrophes sur les bactéries, a été calculé par la comparaison des taux de croissance bactérien obtenus dans les différentes enceintes. Le nombre de virus libérés par événement de lyse a été calculé par analyse des échantillons en microscopie électronique à transmission. Les paramètres classiques du milieu ambiant (température, lumière, chlorophylle, pH, oxygène...) ont été mesurés à l'aide de sondes immergeables multiparamétriques (voir chapitre III.1).

Tableau III-2 : Synthèse des analyses effectuées lors des expériences de fractionnement/enrichissement en fonction du temps d'incubation, T (exprimé en heures). CMF= analyses en cytométrie en flux, MET= analyses en microscopie électronique à transmission, MEF= analyses en microscopie électronique à épifluorescence.

	T0	T96
Dénombrement		
Virus	CMF /MET	CMF
Bactéries Hétérotrophes	CMF	CMF
Picocyanobactéries	CMF	CMF
Petits Eucaryotes Autotrophes	CMF	CMF
Flagellés	MEF	MEF
Ciliés	MEF	MEF
Diversité		
Bactéries Hétérotrophes	DGGE	DGGE

III.4 Les outils d'analyse

III.4.a La cytométrie en flux (CMF)

La cytométrie en flux est une technique qui permet de compter une par une les cellules d'un échantillon en suspension dans un liquide, de discriminer des sous-populations

homogènes sur des critères de fluorescence et de taille, et éventuellement de les trier en fonction de leurs propriétés optiques. Le cytomètre en flux se compose de trois parties: une partie fluidique, une partie optique et une partie électronique/informatique. Pour certains appareils, il existe en plus une fonction de tri. Le schéma type du cytomètre en flux est illustré dans la Fig. III-4. Les cellules ou les particules en suspension dans l'échantillon à analyser (A) sont soumises à une surpression (L) qui les injecte au centre de la veine liquide (I) appelée liquide de gaine. L'écoulement du liquide de gaine est plus rapide que la suspension cellulaire, créant un flux laminaire. Ce flux laminaire permet aux deux liquides de ne pas se mélanger et de progresser chacun selon leur propre trajectoire. Les cellules sous l'effet de la pression vont adopter une progression particulière en file indienne et défilent à plus de 30 Km/h devant le faisceau laser (B).

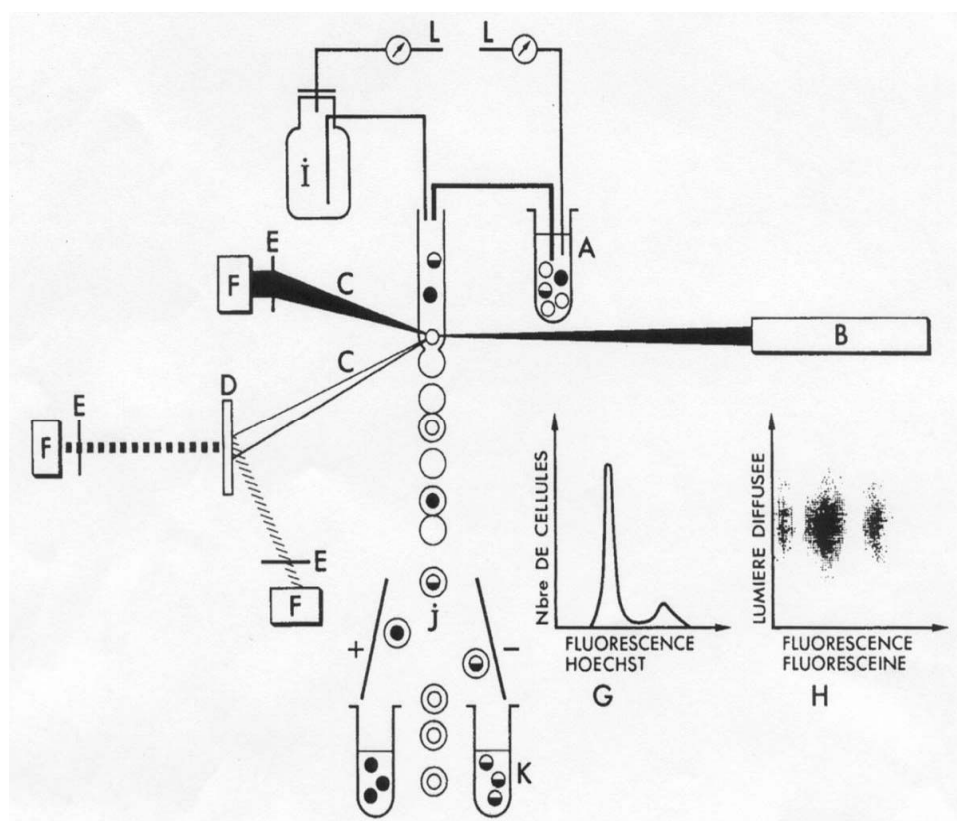


Figure III-4 : Schéma du principe de la cytométrie en flux (voir texte pour explications). Métézeau et al. (1988).

Le faisceau laser va irradier une à une durant quelques micro-secondes toutes les cellules à la cadence moyenne choisie de 100 à 1000 particules par seconde en fonction du débit (réglable) du fluide et de la concentration (manipulable) des cellules/particules dans les échantillons. Durant cet instant chaque cellule diffuse toujours une partie de la lumière

incidente (lumière diffractée) et émet simultanément une ou plusieurs fluorescences en fonction des composés cellulaires présents ou des sondes fluorescentes utilisées.

L'intensité de la lumière diffractée par la cellule, recueillie dans l'axe de la lumière incidente (Fig. III-5), dite "diffraction aux petits angles" (FALS Forward Angle Light Scatter, ou FSC Forward Scatter Channel) c'est-à-dire pour des angles de 2 à 6°, est en relation proportionnelle avec la taille, la forme, et l'indice de réfraction cellulaire. L'intensité de la lumière diffractée par la cellule (Fig. III-5), recueillie de 8° à 90° de l'axe de la lumière incidente, "diffraction aux grands angles", (RALS Right Angle Light Scatter, ou SSC Side Scatter Channel), est en relation proportionnelle avec l'hétérogénéité du contenu cellulaire, la présence/absence et taille de granulation cytoplasmique, la forme et taille du noyau, etc ...

L'excitation par le laser des pigments photosynthétiques naturels ou des fluochromes utilisés contenus dans les cellules provoque l'émission d'un signal de fluorescence recueilli par des détecteurs optiques. Ces détecteurs optiques ou photomultiplicateurs sont classés selon la longueur d'émission de la fluorescence reçue. On distingue le FL1 dont le photomultiplicateur enregistre la fluorescence verte (émise par le complexe marqueur-acides nucléiques), le FL2 la fluorescence orange (émise par la phycoérythrine des cyanobactéries et des cryptophycées) et le FL3 la fluorescence rouge (émise par la chlorophylle).

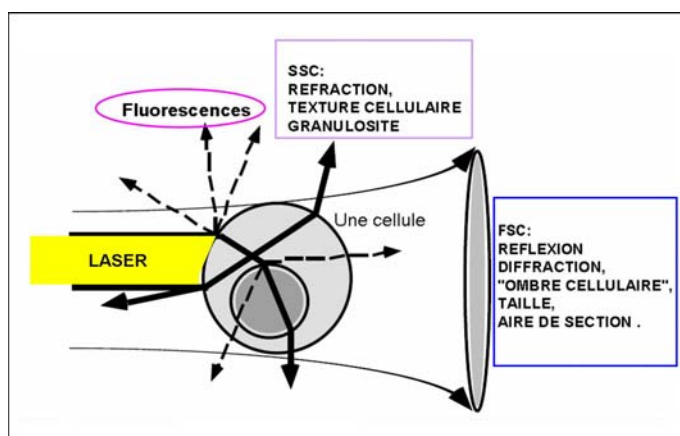


Figure III-5 : Les paramètres obtenus en cytométrie en flux : Diffusions lumineuses et fluorescences. Emis dans toutes les directions de l'espace, les signaux sont captés dans deux directions privilégiées : diffusion aux petits angles (FSC) et diffusion orthogonale (SSC et fluorescence). Source : Roland Greimers ©université de Liège

Les cellules émettent donc des signaux optiques (C) qui sont déviés et sélectionnés par des miroirs (D) et filtres spécifiques (E) puis récoltés par ces détecteurs photosensibles (photodiodes ou photomultiplicateurs F), Fig. III-4. Les cellules après l'excitation au laser, peuvent sur certains appareils (type EPICS) être séparées, triées et récoltées (K) après avoir

été chargées électriquement en passant devant un champ électrique (J), Fig. III-4. Sur d'autres appareils (type FACS), le tri peut également se faire à partir d'un "catchertube" qui se déplace à grande vitesse pour aspirer la cellule d'intérêt. Les résultats de l'analyse apparaissent sous forme d'histogramme monoparamétrique (G) ou biparamétrique (H). L'histogramme ou diagramme de dispersion (« dot plot ») va donc constituer la représentation fondamentale des données de cytométrie dans lequel chaque point représente une seule cellule classée selon les valeurs corrélées des paramètres choisis (Fig. III-4).

III.4.b La microscopie à épifluorescence et la microscopie électronique à transmission

La microscopie optique à épifluorescence a été utilisée pour visualiser des cellules et plus spécifiquement leur matériel nucléaire après excitation par une source lumineuse (laser). Les échantillons analysés sont en général, pour ce qui concerne les procaryotes ou petites eucaryotes, fixés, filtrés, éventuellement marqués par des fluorochromes (la fluorescence naturelle de certaines populations pigmentées peut suffire à l'observation), montés entre lame et lamelle pour être visualisés en microscopie à épifluorescence. Très souvent, le fluorochrome utilisé se fixe au niveau du matériel nucléaire ADN ou ARN comme par exemple le DAPI et le SYBR Green, mais d'autres fluorochromes comme la primuline peuvent être utilisés pour marquer les polysaccharides.

La microscopie électronique à transmission utilise un microscope ressemblant à un microscope « classique », mais qui se trouve inversé et doit être couplé à un système de pompage qui réalise le vide dans la colonne du microscope. Ce vide est nécessaire pour permettre le déplacement des électrons et leur permettre de traverser l'échantillon pour en établir une image nette. Le flux des électrons provient du chauffage d'un filament et de l'accélération des électrons libérés par le filament au moyen d'une différence de potentiel de 60 à 100 kilovolts. Le flux des électrons peut être focalisé au moyen de lentilles magnétiques situées dans les parois de la colonne du microscope. L'image d'un échantillon biologique est obtenue par « coloration » de l'échantillon au moyen de substances denses aux électrons qui se localisent préférentiellement au niveau des membranes biologiques (citrates de plomb) ou au niveau des acides nucléiques (acétate d'uranyle). De plus, l'échantillon biologique, pour être étudié au microscope électronique à transmission, doit subir une préparation qui fixe ou élimine toute substance volatile et qui réalise des sections extrêmement fines (50 nanomètres d'épaisseur).

III.4.c La DGGE

Le descriptif de la DGGE comme outil d'analyse et les différentes étapes détaillées du protocole utilisé sont disponibles en Annexe V. L'extraction d'ADN effectuée est celle décrite par Massana *et al.* (1997) mais légèrement modifiée (voir Annexe V). L'amplification PCR de l'ADN extrait et le protocole de DGGE ont été réalisés en suivant le protocole préconisé par Schauer *et al.* (2000).

III.5 Les protocoles

III.5.a Dénombrements des micro-organismes en cytométrie en flux

Les analyses réalisées au cours de ces travaux ont été effectuées au moyen d'un cytomètre en flux de type FACSCalibur (Becton Dickinson) équipé d'un laser procurant 15 mW à 488 nm. Les études expérimentales permettant d'optimiser les protocoles du dénombrement des communautés microbiennes ont préalablement été décrites dans Marie *et al.* (1999, 2000), Brussard (2004). Cependant ces protocoles ont été proposés pour des échantillons issus du milieu marin ou pour des cultures. Afin de réaliser des analyses avec un protocole adapté à l'analyse des échantillons issus des lacs péri-alpins, nous avons réalisé une série de tests permettant d'optimiser la discrimination et le comptage des différents microorganismes au moyen de notre CFM (voir Article I).

En résumé, les analyses ont été réalisées à débit moyen (valeur moyenne du débit sur la période 2003-2006 : 51,6 $\mu\text{l}/\text{min}$) pour les virus et les bactéries et à fort débit pour le phytoplancton (valeur moyenne du débit sur la période 2003-2006 : 86,4 $\mu\text{l}/\text{min}$), en ajoutant 0,5 μl d'une solution de billes fluorescentes diluée (Molecular Probes) dans chaque échantillon.

Les organismes phytoplanctoniques étaient représentés par les picocyanobactéries, des petits eucaryotes autotrophes non identifiés et un ensemble de cellules composé de cyanobactéries et eucaryotes autotrophes riches en pigment phycoerythrine (*i.e.* des cryptophycées). Ces cellules ont été dénombrées grâce à leur fluorescence naturelle.

L'énumération des bactéries et des virus a été obtenue par l'action d'un colorant (agent intercalant de l'ADN), le SYBR Green I (1/10 000), après fixation au glutaraldéhyde (Grade I, 0,25% concentration final) et après dilution des échantillons dans de l'eau du lac filtrée sur 0,2 μm , pour les bactéries et du TE (Tris, EDTA, PH=8) filtrée sur 0,02 μm , pour

les virus. Les fichiers de données de la cytométrie ont été analysés en utilisant le logiciel CYTOWIN (disponible sur le site <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html#cytowin>). Un exemple des signatures cytométriques typique des communautés analysées est donné en Fig. III-6.

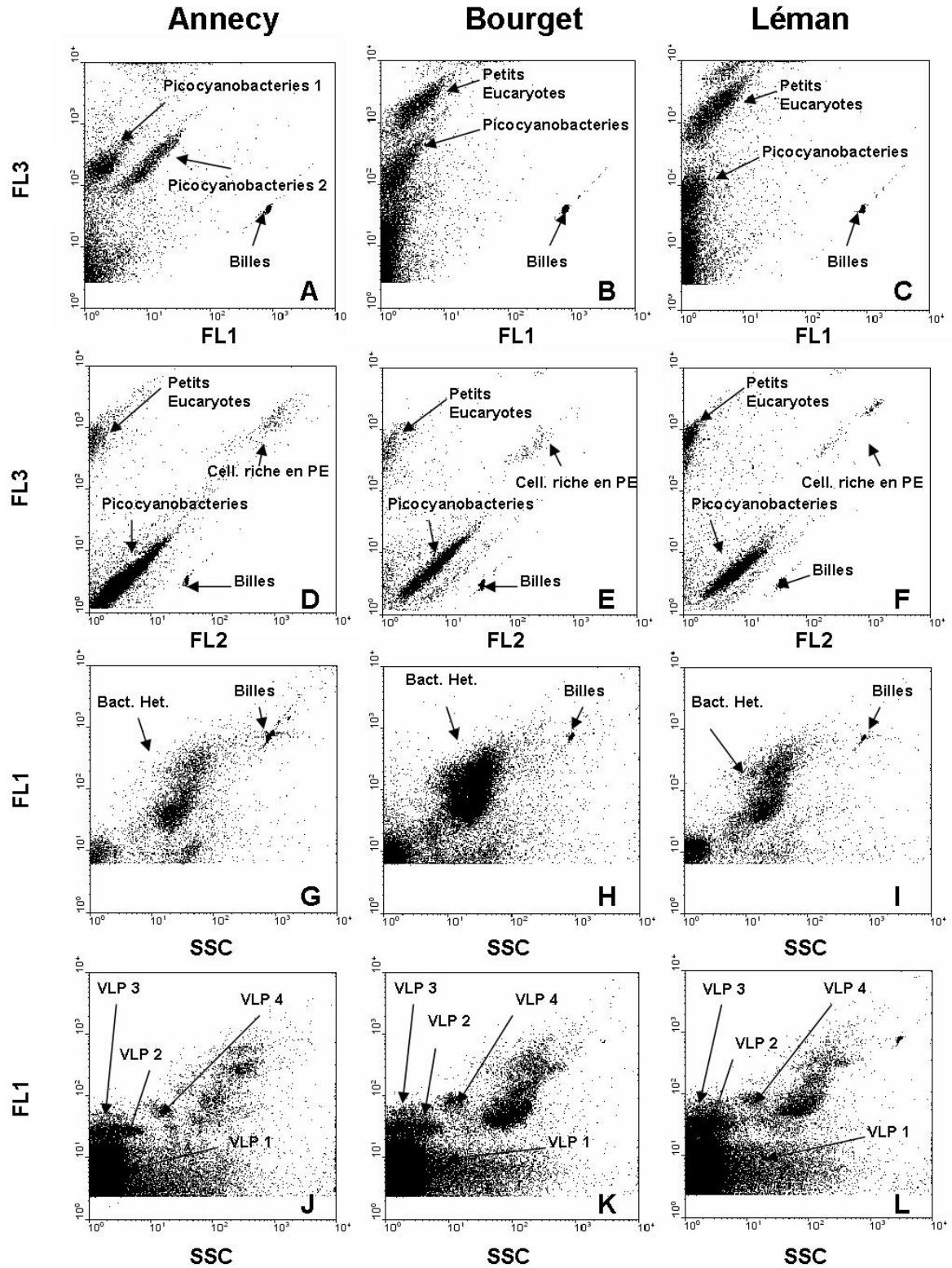


Figure III-6 : Signatures typiques obtenues en cytométrie en flux des picocyanobactéries (A, B, C), petits eucaryotes autotrophes (D, E, F), bactéries hétérotrophes (G, H, I), et des quatre groupes viraux (J, K, L) selon les paramètres cytométriques de taille SSC (size scatter) et de fluorescence FL1 (fluorescence verte), FL3 (fluorescence rouge).

Une fraction des virus sur le diagramme de dispersion, regroupés sous le terme de « Virus Like Particles 1 » soit VLP1 (Fig. III.7), est située à la limite des capacités d'analyse du FACSCalibur. Afin de séparer les particules inertes ainsi que le bruit électronique engendré par l'appareil des particules virales réelles, nous avons réalisé une projection sur l'axe FL1 du nuage de points qui les caractérisent et le logiciel CYTOWIN (Vaulot 1989) permet de modéliser sous la forme d'une courbe gaussienne la projection ainsi obtenue. Cette projection révèle très souvent un pic majoritaire que l'on attribue aux virus (Marie *et al.* 1999).

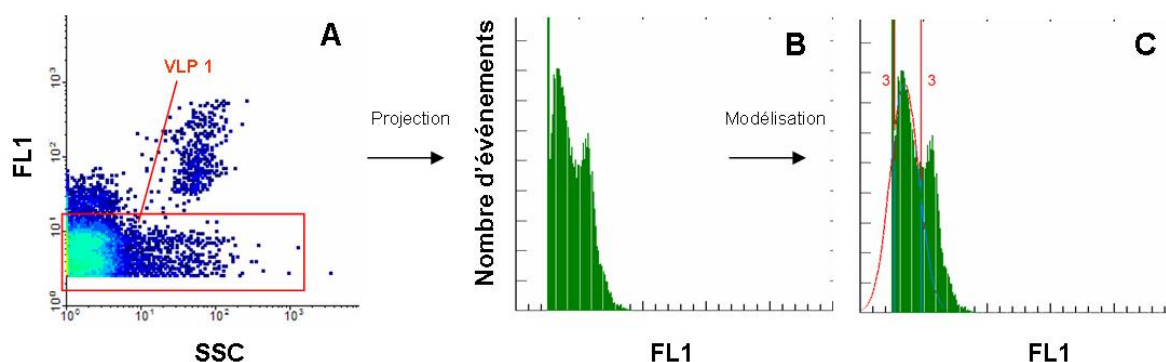


Figure III-7 : Processus de dénombrement des virus VLP1 obtenus en cytométrie en flux (A) par projection sur l'axe FL1 (B) et modélisation par une courbe gaussienne (C) grâce au logiciel CYTOWIN (Vaulot 1989).

III.5.b Dénombrements des protistes flagellés et ciliés en microscopie

La microscopie optique à épifluorescence (pour les flagellés) et la microscopie classique (pour les ciliés) ont permis d'identifier et de compter les protistes hétéro- et mixotrophes (Caron 1983). Les flagellés et ciliés constituent dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy la quasi-totalité de ces communautés. Immédiatement après leur prélèvement, les flagellés ont été fixés au glutaraldéhyde (1% de concentration finale), les ciliés au dichloro-mercure (2,5% de concentration finale) et ont été conservés à 4°C. Les flagellés fixés ont été filtrés dans les 48h (pression < 100 mm Hg) sur des membranes de polycarbonates de diamètre 25 mm et de porosité 0,8 µm. Les membranes des flagellés ont été colorées avec de la primulin (Caron 1983), montées entre lames et lamelles, et stockées à -20°C avant d'être observées. Différentes gammes de lumière du microscope à épifluorescence ont été utilisées pour séparer les flagellés hétérotrophes (UV) des flagellés autotrophes (lumière bleue, amplification 1,25). Pour les ciliés, une étape de sédimentation a été réalisée au préalable

pendant 48 heures à l'aide d'une colonne Uthermol (Sime-Ngando & Hartmann 1990). Les comptages et observations des ciliés ont été réalisés avec un microscope inversé (amplification 1.25). La réalisation du dénombrement des protistes a été effectuée au sein de l'université de Savoie par Annie Millery, Jean Noël Avrillier et Isabelle Domaizon.

III.5.c Utilisation de la microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique qui nous a permis d'évaluer le nombre de virus présent mais également d'obtenir des caractéristiques propres aux virus comme la fréquence de cellules infectées (FIC) et la mortalité bactérienne induite par les virus (VIBM), (Fuhrman & Noble 1995). Cette technique a été utilisée pour différents échantillons de l'expérience de dilution (A) effectuée en 2003 dans le lac du Bourget.

Les échantillons ont été fixés au formol (5% concentration finale). Les bactéries, contenues dans 8 ml de chaque échantillon, ont été récoltées par ultracentrifugation (Centrikon TST 41.14, Rotor tournant à une vitesse de 70000 x g pendant 20 min à 4°C) sur une grille de NI de microscope électronique (maille 400) recouvert d'un film de carbone. Chaque échantillon a été ensuite coloré pendant 30 secondes avec de l'acétate d'uranyle (2% wt/wt) et examiné avec un microscope électronique à transmission (JEOL 1200EX) opérant à 80 kV et amplifiant l'image plus de 40000 fois. Une bactérie est considérée infectée quand les bactériophages à l'intérieur sont clairement reconnaissables sur une base de forme et de taille. Au minimum 600 cellules bactériennes ont été inspectées par échantillon pour une fourchette de 20 à 25 cellules infectées par échantillon, le minimum de phages trouvés dans une cellule infectée était de 3 à 5. Pour estimer la mortalité bactérienne induite par les virus (VIBM), la fréquence visible de cellules infectées (FVIC, comme %) a tout d'abord été reliée à la fréquence de cellules infectées (FIC) par la formule : $FIC = 9.524 FVIC - 3.256$ (Weinbauer *et al.* 2002). La fréquence de cellules infectées (FIC) a été ensuite convertie en mortalité bactérienne induite par les virus (VIBM) par la formule de Binder (1999): $VIBM = (FIC + 0.6 FIC^2) / (1 - 1.2 FIC)$. Dans un système stable, la mortalité bactérienne due à la lyse virale est équivalente à la production bactérienne qui elle-même est freinée par la lyse virale (Suttle 1994). Ainsi en multipliant la production bactérienne lysée par le nombre de virus produit par cellules nous obtenons la production virale (Weinbauer & Höfle 1998). Ces analyses ont été réalisées par Jonathan Colombet et Telesphore Sime Ngando du Laboratoire de Biologie des Protistes à Clermont Ferrand.

III.6. ARTICLE I

III.6.a Contexte de l'étude

De fortes densités de virus dans les écosystèmes aquatiques furent observées pour la première fois par Torella & Morita en 1979 au moyen de la microscopie électronique à transmission (MET). Depuis, ces fortes abondances ont été confirmées à maintes reprises au moyen de cette technique, après ultrafiltration des échantillons (Proctor & Fuhrman 1990, Paul *et al.* 1991) ou ultracentrifugation (Bergh *et al.* 1989, Børsheim *et al.* 1990, Bratbak & Heldal 1993; Sime-Ngando 1997; Bergström & Jansson 2000). Bien que reconnue comme une technique de référence pour le dénombrement des virus et surtout incontournable pour estimer le pourcentage de bactéries infectées, la MET présente également quelques inconvénients (Bergh *et al.* 1989) qui la rendent inappropriée au suivi en routine des concentrations virales des milieux naturels. La MET est une technologie nécessitant un personnel hautement qualifié et son coût est souvent prohibitif pour les laboratoires qui donc n'en sont pas dotés. Depuis le milieu des années 1990, l'utilisation de la microscopie à épifluorescence (MEF), associée à des marqueurs fluorescents de plus en plus performants, a permis de dénombrer les particules virales beaucoup plus rapidement (Hara *et al.* 1991, Hennes & Suttle 1995, Lisle *et al.* 2004). A la fin des années 1990, le dénombrement en routine et de manière conjointe des virus et des bactéries hétérotrophes a été rendu possible par utilisation de la cytométrie en flux (MCF). Là encore, le couplage de cette technique avec des marqueurs fluorescents de la famille des SYBR pour ne citer que les principaux (Noble & Fuhrman 1998; Marie *et al.* 1999, Shopov *et al.* 2000, Chen *et al.* 2001, Jacquet *et al.* 2002, Middelboe & Glud 2003, Wen *et al.* 2004) ont permis d'effectuer des dénombrements extrêmement rapides avec une très forte reproductibilité (Brussaard *et al.* 2000, Vives-Rego *et al.* 2000, Li & Dickie 2001).

Quelques études ont comparé deux de ces trois méthodes, notamment la MEF vs. la MCF (Gasol *et al.* 1999, Jochem 2001, Lemarchand *et al.*, 2001), ou la MEF vs. la MET (Hara *et al.* 1991, Hennes & Suttle 1995, Bettarel *et al.* 2000, Noble 2001) et plus rarement les trois techniques simultanément en terme de comptages bactériens et viraux (Marie *et al.* 1999, Chen *et al.* 2001, Ferris *et al.* 2002). En résumé, il apparaît que les comptages réalisés en MCF sont toujours corrélés, et légèrement supérieurs, aux comptages en MEF et MET. De

plus la MCF semble être la technique la plus adaptée quand les échantillons peuvent être analysés directement sans l'intervention de méthodes de préconcentration.

Une grande variété de procédures pour la fixation et la coloration des échantillons a été proposée pour la cytométrie en flux depuis plus de 10 ans. Historiquement, les premiers efforts ont surtout porté sur les protocoles de conservation du bacterio- et du virioplancton marin issus d'échantillons naturels (Turley & Hughes 1992, Troussellier *et al.* 1995, Lebaron *et al.* 1998), puis pour les virus marins pour leur analyse en CFM (Marie *et al.* 1999, Brussaard 2004). Comparativement, très peu d'études se sont intéressées à ce type de procédure pour les milieux d'eau douce (Lebaron *et al.* 1998). C'est à partir de ce constat et avec pour objectif d'optimiser nos procédures de comptage dans le cadre du suivi des abondances des microorganismes au sein des lacs péri-alpins que nous avons testé un certain nombre de fixateurs, colorants, diluants, etc...

III.6.b Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude a été d'optimiser les protocoles de dénombrements en cytométrie en flux des virus et des bactéries hétérotrophes, présents dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy. Nos tests ont porté sur l'utilisation de différents marqueurs fluorescents (de la famille des SYBR : SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR Gold, SYBR Safe), de différents temps d'incubation, de différents fixateurs, de différentes solutions de dilution des échantillons et de différentes conditions de stockage de ces derniers. Des tests similaires ont également été conduits pour dénombrer les virus et bactéries hétérotrophes par microscopie à épifluorescence. Les deux techniques ont ainsi pu être comparées pour différents échantillons de différentes profondeurs des lacs et ceci à différentes périodes de l'année.

III.6.c Principaux résultats obtenus

L'ensemble des tests réalisés a permis de proposer un protocole optimisé pour un dénombrement performant et reproductible des virus et des bactéries hétérotrophes dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy. Nos résultats soulignent une nouvelle fois la non universalité des protocoles et le caractère essentiel de ces tests afin de dénombrer correctement les virus et les bactéries hétérotrophes dans un milieu donné. Brièvement nos résultats pour la cytométrie en flux, nous ont permis d'améliorer les dénombrements des bactéries en utilisant comme fixateur du glutaraldehyde à une concentration finale de 1 à 2%

et une coloration au SYBR Green I. De manière différente pour les virus, c'est la coloration au SYBR Gold, sans nécessairement utiliser un fixateur, qui a amélioré les dénombrements. De manière identique pour les deux communautés, une conservation à -196°C dans de l'azote liquide a été préconisée en cas de non dénombrement en cytométrie en flux des communautés dans les 24 heures après leur prélèvement mais a tout de même révélé une surestimation des communautés. En revanche, pour la microscopie à épifluorescence, une simple conservation à -20°C (pendant moins d'un mois) des filtres contenant les bactéries et les virus colorés au SYBR Gold a permis de conserver une qualité dans le dénombrement de ces communautés. Les comparaisons des comptages en CMF et MEF ont permis de mettre en évidence la dominance systématique des valeurs de comptages en CMF de 2,13 fois pour les bactéries hétérotrophes et de 1,47 fois pour les virus.

Necessary tests for accurate counting of lake bacteria and viruses using either flow cytometry or epifluorescence microscopy

Freshwater Biology (En révision)

Ursula DORIGO*, Sébastien PERSONNIC, Stéphan JACQUET

UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon cedex, France

* To whom correspondence should be addressed

Dorigo@thonon.inra.fr ; Tel: +33.4.50.26.78.12 ; Fax : +33.4.50.26.07.60

Key words: bacteria, viruses, flow cytometry, epifluorescence microscopy, Alpine lakes

Running head line: Counts of freshwater bacterio- and virioplankton

Summary

1. We tested a broad battery of counting and storage procedures to enumerate freshwater viruses and bacteria (from peri-alpine lakes) by flow cytometry (FCM) and epifluorescence microscopy (EFM).
2. Different types and concentrations of fixatives, stains belonging to the SYBR family, dilution media, temperature and storage conditions were tested. Whenever possible, FCM and EFM counts were compared.
3. Results obtained using FCM supported the addition of fixative for bacteria, preferably glutaraldehyde at a final concentration of 1 or 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} 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 80°C for 10 minutes is recommended.
4. If possible, FCM samples should be counted on day = 0 or alternatively 24h later. Storage a few days to weeks at -80°C following freezing in liquid nitrogen, provided on average 22% higher bacterial and viral counts compared to counts made at the date of sampling by using the best protocol.
5. The conditions required for optimum EFM counts of both bacteria and viruses involved were to stain 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 .
6. Our main conclusion is that each laboratory should perform its own tests to be sure to obtain the best results for any type of ecosystem they study.

Introduction

Bacteria and viruses have been shown to be important components of aquatic microbial communities because of their abundance, ubiquity and impact on nutrient cycling, energy fluxes and microbial food webs (Azam *et al.*, 1983; Fuhrman, 1999; Wilhelm & Suttle, 1999). Bacterioplankton is mainly responsible for the recycling of nutrients and the decomposition of organic matter in the pelagic zone of freshwater ecosystems (Fisher *et al.*, 2000). Bacterioplankton is also a major food source for small and large protozoa (Simek *et al.*, 1990; Berninger, 1991; Domaizon *et al.*, 2003). Viruses play an important role in the control of plankton community composition, diversity and succession, through host cell mortality. The impact of virus mediated bacterioplankton cell mortality vary according to the ecosystem, time and space (Wommack & Colwell, 2000; Sime-Ngando *et al.*, 2003; Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Viruses are responsible for 10-60% of the daily bacterioplankton mortality (Simek *et al.*, 2001; Fischer & Velimirov, 2002; Bettarel *et al.*, 2003; Bettarel *et al.*, 2004), and are the most abundant biological particles in aquatic environments, with abundances typically ranging from 10^7 to 10^9 viruses ml^{-1} (Bergh *et al.*, 1989; Wommack & Colwell, 2000). Bacterioplankton densities typically range from 10^5 to 10^7 cells ml^{-1} (Bettarel *et al.*, 2003). These abundances can vary considerably both with time and space (Øvreås *et al.*, 2003; Schröder *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2004) due to the influence of physico-chemical and/or biological parameters. In order to get a better understanding of the ecology of these microorganisms and their role in aquatic systems, we need accurate and rapid determinations of their abundances performed at high frequencies in terms of time and space.

In the 1970's bacteria were quantified by transmission electron microscopy (TEM) (Watson *et al.*, 1977) or by epifluorescence microscopy (EFM) on acridine stained samples (Francisco *et al.*, 1973). High viral densities within an aquatic ecosystem were first discovered by Torella & Morita (1979). Later, more accurate viral numbers were obtained using TEM after ultrafiltration (Proctor & Fuhrman, 1990; Paul *et al.*, 1991) or ultracentrifugation (Bergh *et al.*, 1989; Børsheim *et al.*, 1990; Bratbak & Høgdal, 1993; Sime-Ngando, 1997; Bergström & Jansson, 2000). However, this technique is not only tedious and very time consuming, but also involves some uncertainties arising from the concentration procedures, requires expensive equipment (Bergh *et al.*, 1989) and skilled personnel. Clearly, these features make it unsuitable for routine field analysis.

Since the 1990's, the use of EFM in conjunction with the development of new, highly-fluorescent nucleic acid dyes rapidly supplanted TEM, since it was a quicker and less expensive technology (Hara *et al.*, 1991; Hennes & Suttle, 1995; Lisle *et al.*, 2004). Nowadays, aquatic bacteria and viruses may be counted by flow cytometry (FCM) using fluorochromes such as those belonging to the SYBR family (Noble & Fuhrman, 1998; Marie *et al.*, 1999a; Shopov *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Middelboe & Glud, 2003; Wen *et al.*, 2004). FCM can be used to perform very accurate and fast counts (Brussaard *et al.*, 2000; Vives-Rego *et al.*, 2000; Li & Dickie, 2001), generally in less than a few minutes per sample including its preparation (Marie *et al.*, 1999b). These last two points are important when a large number of samples have to be analyzed and statistically significant data are required. Unfortunately, as counting cannot always be done on the same day as sampling, reliable fixing and storage procedures may be a critical aspect. A wide range of procedures, fixatives and dyes has been proposed to date.

Historically, considerable efforts have been made to develop procedures that accurately determine and preserve marine bacterioplankton and virioplankton in natural samples (Turley & Hughes, 1992; Troussellier *et al.*, 1995; Lebaron *et al.*, 1998a) and marine viruses in cultures (Marie *et al.*, 1999a; Brussaard, 2004); but still only a few studies have

been done involving freshwater samples (Lebaron *et al.*, 1998a). Some FCM studies have compared various preservatives and storage protocols (Turley & Hughes, 1992; Marie *et al.*, 1999a, Troussellier *et al.*, 1995), or the use of different nucleic acid stains (Lebaron *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 2001). Different dilution solutions or incubation temperatures have been tested on virus counts by Brussaard (2004). Similar work has also been done for EFM (Brussaard, 2004). Some studies have attempted to compare two of the three methods, typically either EFM vs. FCM (Gasol *et al.*, 1999; Jochem, 2001; Lemarchand *et al.*, 2001) or EFM vs. TEM (Hara *et al.*, 1991; Hennes & Suttle, 1995; Bettarel *et al.*, 2000; Noble, 2001); but very few studies have attempted to compare the effectiveness of all three techniques (TEM, EFM, and FCM) for performing direct total counts of bacteria or viruses (Marie *et al.*, 1999a; Chen *et al.*, 2001; Ferris *et al.*, 2002). It would appear that the FCM counts were always correlated to, but slightly higher than those obtained by EFM or by TEM. In addition, commercial flow cytometers always seemed advantageous since samples can be analysed directly without the need for particle collection or pre-concentration methods.

In this study, FCM tests involved the most popular stains of the SYBR family, and various incubation temperatures, fixatives and dilution solutions and various storage conditions to optimize the counts of viral and of bacterial communities which were sampled within the three largest natural French lakes (Annecy, Bourget and Geneva). Similar tests were done using EFM, and whenever possible, the two techniques were compared for different sampling depths and at different periods of the year.

Methods

Sample collection

Plastic bottles, previously rinsed with water from the collection site were used to collect water samples, between September 2002 and November 2004, from the mesotrophic lakes Bourget (Jacquet *et al.*, 2005) and Geneva (Duhamel *et al.*, 2006) and from the oligotrophic Lake Annecy (Domaizon *et al.*, 2003). Lake water was transported within two hours to the laboratory in refrigerated boxes, and processed without delay for subsequent experiments. Data from Experiments 1-7 were used to test a wide range of dilution solutions, staining, fixation and storage conditions in FCM. Experiment 9 was specifically designed to optimize EFM counts of bacteria and viruses (see below). Finally, the data obtained by EFM and FCM were compared.

All nucleic-acid specific dyes were delivered in dimethyl sulfoxide and stored at -20°C. Fixatives and dilution solutions were adjusted to a final pH of 7.5 and were filtered through 0.2 µm (for bacterial analyses) or 0.02 µm (for viral analyses) using syringe filter (Millipore) in order to avoid contamination. Fixation was performed for at least 15 min at ambient temperature, *i.e.* ~20°C, and each sample was slightly vortexed and diluted at least 50 fold in the dilution solution. Incubation with the dye occurred at dim light at 20, 45, 65 or 80°C (see later). Details of the buffered dilution solutions, stains and fixatives are provided in Tab. 1.

Table 1 Details of the dilution solutions, dyes and fixatives used in this study

^a: preferential DNA stain, ^b: preferential RNA stain, ^c: DNA and RNA stain without preferences, ^e: Reduces base hydrolysis by chelating divalent cations with EDTA, ^y: information not provided by the manufacturer, ^z: estimation provided by Molecular Probes

Name and concentration used	Chemical composition	Classification	Characteristics and use
TE (1X)	10 mM Tris, 1 mM EDTA ^e	Buffer	Elution and storage of DNA/RNA
TAE (1X)	40 mM Tris acetate, 20 mM sodium acetate, 1 mM Na ₂ -EDTA ^e	Buffer	Used in electrophoresis; better resolution of supercoiled DNAs than TBE (Dingman and Peacock, 1968)
TBE (1X)	89 mM Tris-base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA ^e	Buffer	Used in electrophoresis; more stable and higher buffering capacity than TAE (Ogden and Deborah, 1987)
FACSFlow	Sodium phosphate, preservatives, sodium chloride, disodium EDTA, potassium chloride, potassium phosphate. Concentration unknown (y)	Sheath fluid for FCM	Used in FCM only
PBS	0.01M phosphate buffered saline, 0.138M NaCl, 0.0027M KCL	Buffer	Used as washing of sections in immunohistology staining procedures
SYBR Green I ^a	Composition unknown (y) Provided as 10,000X concentrate in DMSO	Fluorescence dye (intercalating type) (Marie <i>et al.</i> , 1997 ; Marie <i>et al.</i> , 1999b ; Noble, 2001)	dsDNA, ssDNA, RNA, excitation at 290, 380 and 497 nm. Emission maximum at 520 nm. Quantum yield for DNA and RNA, 0.8 and 0.4 (z)
SYBR Green II ^b	Composition unknown (y), provided as 10,000X concentrate in DMSO	Fluorescence dye (intercalating type) (Lebaron <i>et al.</i> , 1998)	RNA, ssDNA, dsDNA sensitivity for oligonucleotides detection. Excitation at 254 and 497nm. Emission at 520 nm. Quantum yield for DNA and RNA, 0.36 and 0.54 (z)
SYBR Gold ^c	Composition unknown (y), provided as 10,000X concentrate in DMSO	Fluorescence dye (intercalating type) (Chen <i>et al.</i> , 2001; Noble, 2001)	ssDNA, ssDNA, RNA, excitation maxima at 300 and 495nm, emission maximum 537nm. Quantum yield for DNA and RNA of 0.6 (z)
FA (Formaldehyde)	Aldehyde (CH ₂ O) Forms methylene hydrate in water (the active ingredient of the fixative)	Fixative	Crosslinks cell membrane proteins and viral coat proteins. Rapid penetration rate, reacts with proteins, unsaturated fatty acids and DNA, higher cell fluorescence than GA (Troussellier <i>et al.</i> , 1995; West <i>et al.</i> , 2001)
GA (Glutaraldehyde)	Aldehyde (C ₄ H ₆ (OH) ₂),	Fixative	Cells keeps osmotic properties, reacts only slightly with lipids
PF (Paraformaldehyde)	Aldehyde (PBS and paraformaldehyde, pH 7.4) Polymers of methylene hydrate = the polymerized form of FA which lacks cross-linking properties	Fixative	Higher cell fluorescence than GA (Troussellier <i>et al.</i> , 1995; West <i>et al.</i> , 2001)

Experiment 1

This experiment was designed principally to choose among a wide panel of dilution solutions (TE, TAE, TBE, lake water, FACSFlow and PBS) for FCM analyses of heterotrophic bacteria. Samples were left untreated or fixed with formaldehyde (FA 1 or 2% final concentration, Sigma), glutaraldehyde (GA 0.25 or 1%, Sigma) or paraformaldehyde (PF 1 or 2%, freshly prepared home-made solution following Marie *et al.*, 1999b). After fixation, samples were diluted in each dilution solution and finally stained for 15 min at 20°C with either SYBR Green I and II (final concentration of 10^{-4} , Molecular Probes) (Marie *et al.*, 1997) in order to be analyzed by FCM.

Experiment 2

The type and the final concentrations of the fixative (GA 1 and 2%, PF 1 and 2%, FA 1 and 2% and PF 1% mixed with GA 0.05%) were tested, as were the storage temperature (4°C or -20°C) and duration ($t = 0, 1, 8, 30$ days) for bacterioplankton counts by FCM analyses. From experiment 1, we retained treatments that had given the best statistical results for both cell abundance and FCM signatures (TAE, TE, TBE and lake water among the dilution solutions and the SYBR Green I). Briefly, 10 mL subsamples were immediately treated with one concentration of a given fixative. Another subsample was kept without fixative. From each of these subsamples, three sets of 1 mL samples were prepared. The first set of duplicate samples was analysed at t_0 . The second set of duplicate samples was kept at 4°C and was analysed on days 1, 8 and 30 after leaving them for 15 min at room temperature (previous experiments had shown that cold samples had a negative effect on the quality of the FCM signature). The third set consisted of three 1 mL duplicates which were thawed only once (in order to avoid repeated thawing/refreezing steps) on days 1, 8 or 30. After storage, refrigerated and frozen samples were brought to room temperature as previous experiments had shown that cold samples had a negative effect on the quality of the FCM signature. All samples were slightly vortexed diluted and stained for 15 min at room temperature with the nucleic acid dye SYBR Green I at a final concentration of 10^{-4} (Marie *et al.*, 1997).

Experiment 3

The staining characteristics and in particular the staining kinetics of SYBR Green I and SYBR Gold, both at a final concentration of 10^{-4} , were analyzed using bacterioplankton samples which had been fixed with GA 2%. Samples were diluted in TE buffer, and replicate samples were analyzed by FCM at regular intervals after incubating with the dye for 1 min to 1 h.

Experiment 4

This experiment was done to compare the staining efficiencies of SYBR Green I (final concentration of 10^{-4}) and SYBR Gold (final concentration of 10^{-4} , 5×10^{-5} , 2×10^{-5}) for counting bacteria and viruses by FCM. Note that SYBR Safe was also tested. Briefly, 12 samples which were fixed to a final concentration of 1% GA were diluted in TE or lake water and analyzed by FCM after incubating with the stain for 15 min at 20°C for bacteria, or after incubating at 45°C, 65°C or 80°C for viruses according to Marie *et al.* (1999a) and Brussaard (2004).

Experiment 5

This experiment aimed to test the use of fixatives and dilution solutions on FCM virus counts. Samples were fixed with FA or GA (1% final concentration) or left untreated and dilution was performed in lake water, in TE and in TBE. All samples were stained with either

SYBR Green I or SYBR Gold, at a final concentration of 10^{-4} . Incubation was performed at 80°C (Marie *et al.*, 1999b).

Experiment 6

A range of incubation temperatures were tested to perform bacterioplankton FCM counts. Samples were either left unfixed or fixed with 1% or 2% GA and analyzed at day = 0 or at day = 1 after storage at 4°C. For FCM analyses, samples were diluted in TE or in lake water and stained with SYBR Green I (final concentration of 10^{-4}) and subjected to various incubation temperatures 20°C (15 min), 45°C and 80°C, the latter two lasting for 10 min, followed by cooling for 5 min at room temperature.

Experiment 7

We tested here the bacterial and viral counts obtained after rapid freezing in liquid nitrogen followed by storage at -80°C as suggested by Brussaard (2004) *versus* counts obtained using recommended conditions following experiments 1-6 and without using liquid nitrogen. Samples were counted after a storage time of 40 days.

Experiment 8

This experiment was performed in order to test different ways of using TE for FCM virus counts. The conditions tested included the final pH of the TE solution (pH 7 or 8, corresponding to the natural pH variation observed in our lakes), autoclaving or not, filtered through a 0.02- μ m or 0.2- μ m filter. Unfixed samples were then diluted in the various types of TE buffer and incubated with SYBR Green I or SYBR Gold, both used at a final concentration of 10^{-4} , for 10 min at 80°C, and FCM analyses were done.

Experiment 9

Tests for EFM counts were done by counting both bacterio- and virioplankton in several water samples. Samples were either left untreated or immediately fixed upon arrival in the laboratory for at least 15 min. FA or GA, were added at final concentrations of 1 and 2% or 0.5 and 1% respectively. 1 mL of the fixed samples was filtered through a 25-mm, 0.02- μ m ultra-fine pore size filter (Anodisc, Fisher Scientific), backed by a 25-mm GF/C filter (Whatman), at low vacuum. Each filter was stained either with SYBR Green I (Noble & Fuhrman, 1998) or with SYBR Gold (Chen *et al.*, 2001), both at a final concentration of 10^{-3} . The filter was finally mounted on a glass slide and 30 μ L of an antifading solution was added, that had been prepared as recommended by Noble (Noble & Fuhrman, 1998) apart from containing less p-phenylenediamine. Briefly, we prepared a solution of 990 μ L of a 50% PBS + 50% glycerol mixture with 10 μ L of 6.6% p-phenylenediamine. Then, a cover slip was placed over the filter. As suggested by Wen *et al.* (2004), the slides were prepared immediately, and if possible counted on the same day or else stored at -20°C for no more than a couple of days. In addition to the viral and bacterial counts at $t = 0$, four replicates of 10 filters (5 filters for bacterial counts, 5 for viral counts), were re-counted after being stored for 16, 29, 53, 68, or 96 days at -20°C in order to assess the importance of counting the slides immediately after they had been prepared. The results have been expressed as a percentage of the counts obtained at $t = 0$.

Comparison of FCM and EFM

A total of 80 samples were analyzed for bacteria and viruses in order to compare the counts obtained by FCM and EFM. For the FCM analyses, samples were fixed in 1% GA, and stained with SYBR Green I at a final concentration of 10^{-4} . Samples for bacterial counts were incubated at room temperature, and samples for viral counts were heated for 10 min to 80°C

and then cooled for 5 min. For EFM analyzes, the samples were fixed with 1 % FA and incubated with SYBR Gold at a final concentration of 10^{-3} . The slides were prepared without delay and either counted immediately or stored at -20°C for up to a few days.

Flow cytometry analyses

We used a FACSCalibur (Becton Dickinson) benchtop flow cytometer, equipped with a blue laser beam fixed at 488 nm and with the standard filter setup. The main FCM procedures were the same as those outlined by Marie *et al.* (1999b), and originally devised for marine bacterioplankton and viroplankton. We decided to use MilliQ water as a sheath fluid since previous laboratory experiments did not show any significant difference between pure water, filtered lake water or FACSFlow provided by BD (not shown). Samples were run at medium speed (*i.e.* between 60 and 70 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, the flow rate being checked before each analysis), and all parameters were acquired in log mode. To avoid coincidence, the number of events was limited to between 100 and 500 per sec by further diluting the sample and/or by raising the threshold of the instrument. Bacterial cell parameters were determined relative to the values found for an internal standard, *i.e.* a solution of 1- μm fluorescent beads (Molecular Probes). Bacteria and viruses were detected from dot plots of right angle light scatter (SSC) versus the green fluorescence of the acid nucleic dye complex (FL1 channel: 530 ± 15 nm) and the red fluorescence of phytoplankton (FL3 channel: >630 nm) versus FL1. For each series of analysis, controls (*i.e.* 0.02 μm -filtered water samples) were always made in order to control and avoid the electronic noise or signals due to debris and particles other than bacteria or viruses. Data were collected in listmode files and then analyzed on a separate PC using the custom-designed software CYTOWIN (Vaulot *et al.*, 1989), available at <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html>. Abundances have been reported as cells mL^{-1} (heterotrophic bacteria) or particles mL^{-1} (viruses).

Epifluorescence counts

We used a LEICA epifluorescence microscope equipped with a mercury lamp and a blue excitation light (450-490 nm). Around 200 bacterial cells (cyanobacteria were excluded from this counting) were counted in 10 randomly selected fields for each filter, and 400-600 viruses were counted in 20 fields. The viral and bacterial abundances have been reported as particles mL^{-1} or cells mL^{-1} respectively, following the procedures outlined by Noble (2001).

Statistics

Bacterial and viral concentrations we obtained following the different treatments were compared and analyzed for significance by using the tests of Mann-Whitney or Kruskal-Wallis with the PAST software package, available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.

Results

Choice of the nucleic acid stain for FCM counts

When the dyes were used at a final concentration of 10^{-4} , SYBR Green II yielded 40% less bacterial numbers, compared to SYBR Green I stained samples (Fig. 1, exp. 1). This figure also shows that the SYBR Green II counts were correlated to the SYBR Green I counts. The fluorescence of the SYBR Green I stained samples reached maximum and stable bacterial abundances after having been incubated with the dye for 10-12 min, whereas the fluorescence of those stained with SYBR Gold increased less rapidly and was less stable (exp. 3). From a qualitative point of view, the bacterial signature was easier to interpret when SYBR Green I stain was used. The 4th experiment, in which we counted bacteria and viruses within various

water samples, gave us an indication of the staining efficiency of SYBR Green I compared to that of various concentrations of SYBR Gold.

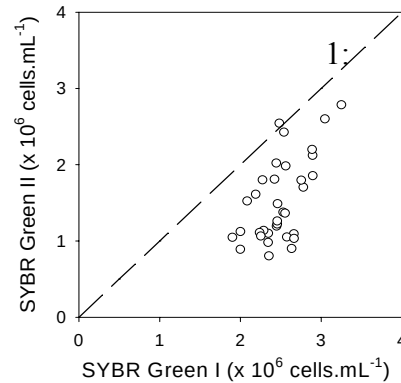


Fig.1. Relationship between SYBR Green I and SYBR Green II, both used at a final concentration of 10^{-4} , for bacterioplankton-stained samples diluted using various dilution solutions (TAE, TE, TBE, lake water, FACSFlow, PBS), fixed with different types and concentrations of fixatives (FA, GA, PF) and analyzed by FCM. $y = 1.11x - 1.23$ ($n = 34$, $r = 0.6$, $p = 0.99$). The dashed line corresponds to the 1:1 relationship. Exp. 1.

As shown in Fig. 2A, average total bacterial cell count was not significantly different for SYBR Green I used at a final concentration of 10^{-4} and SYBR Gold used at one of the range of concentrations (10^{-4} , 5×10^{-5} or 2×10^{-5}). For virus counts staining with SYBR Green I used at a final concentration of 10^{-4} , rather than with SYBR Gold used at concentrations of 10^{-4} , 5×10^{-5} or 2×10^{-5} , gave virus concentrations that were significantly lower (-28%, Fig. 2B).

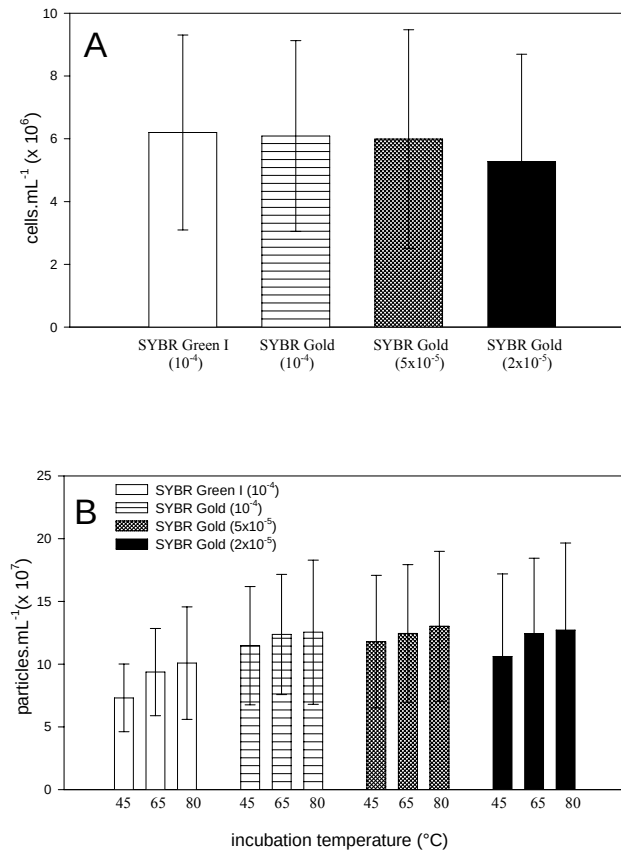


Fig. 2. FCM counts of heterotrophic bacteria (A) or viruses (B) stained with SYBR Green I (10^{-4} , white bars) or SYBR Gold at 3 different concentrations (10^{-4} , hatched bars; 5×10^{-5} , dotted bars; 2×10^{-5} , black bars) for 12 different samples. Viruses were incubated with each dye and concentration tested at 3 different incubation temperatures (45°C, 65°C and 80°C). Error bars are relative to 12 different water samples. Exp. 4.

In addition, the temperature of incubation had a critical role on viral staining efficiency with SYBR Green I (10^{-4}) with mean virus abundances being significantly lower at 45 than at 65 or at 80°C. From a qualitative point of view, the use of SYBR Gold was preferable to using SYBR Green I and the lower the concentrations of SYBR Gold, the greater the number of detectable subpopulations within the viral community, whatever the temperatures of incubation (Fig. 3). At 80°C, up to 5 populations could be detected using the lowest concentration of SYBR Gold, while only 3 populations could generally be detected using the highest concentration of SYBR Gold or SYBR Green I.

The results of the 5th experiment, showed again that SYBR Gold and SYBR Green I counts in different water samples, correlate very closely and positively ($n = 98$, $r = 0.42$, $p = 0.99$ for viruses, $n = 65$, $r = 0.94$, $p = 0.99$ for bacteria). In Exp. 4, virus counts were still correlated, but were significantly lower when SYBR Green I was used rather than SYBR Gold (about 20% lower in the case of the 80°C series). Such differences were clearly confirmed here.

The choice of the dilution solution for FCM counts

Throughout exp. 1, FACSFlow and PBS used as the dilution solution provided the lowest bacterial concentrations, 16% (SYBR Green I) and 52% (SYBR Green II) less than when samples were diluted in TE. From a qualitative point of view, TE, TAE and TBE allowed to distinguish different populations (Fig. 4A). By comparison, filtered lake water furnished the most compact signatures in combination with unfixed samples (Fig. 4B). In addition, the findings of the second experiment were similar, *i.e.* no significant quantitative differences were observed between TE, TAE, TBE or lake water at t_0 (not shown here). At t_1 , t_8 and t_{30} , the results were surprisingly different. Bacterial counts were significantly higher when samples that had been stored at 4°C or at -20°C, were diluted in TE or in lake water, than when they were diluted in TAE or TBE. For instance, TBE dilution gave values up to 15% lower than when TE was used. Considering all the viral counts, regardless of whether SYBR Green I or SYBR Gold stain was used, no significant differences were observed after diluting in TE or in lake water. Nevertheless, as for the bacterial counts, TE made it possible to distinguish between various viral subpopulations. Autoclaved or non-autoclaved TE influenced virus counts (exp. 8). Indeed, when using non-autoclaved TE buffer, some virus populations, which are situated at the lowest fluorescence values within the flow cytogram, could overlap with the background noise (corresponding likely to debris and the electronic noise) (Fig. 5A, B). Using autoclaved TE buffer circumvented this problem by reducing the noise and by somehow shifting the background noise away from the virus population signatures (Fig. 5C). Non autoclaved TE buffer did significantly influence the total virus counts obtained. The overlapping of the distributions of both signal and cytometric noise fluorescence resulted in possible overestimations of ca. 30% of the viral population 1 (VLP 1) and referred to as the bacteriophage community (Duhamel *et al.*, 2006), situated at the lowest fluorescence values within the cytogram. When analyzing the controls, we found that the noise within autoclaved controls was reduced up to 7 fold compared to that within the non-autoclaved controls. Total virus counts were not affected by using TE at pH 7 or 8, nor when filtering the recently made buffer through either 0.2 or 0.02 μm .

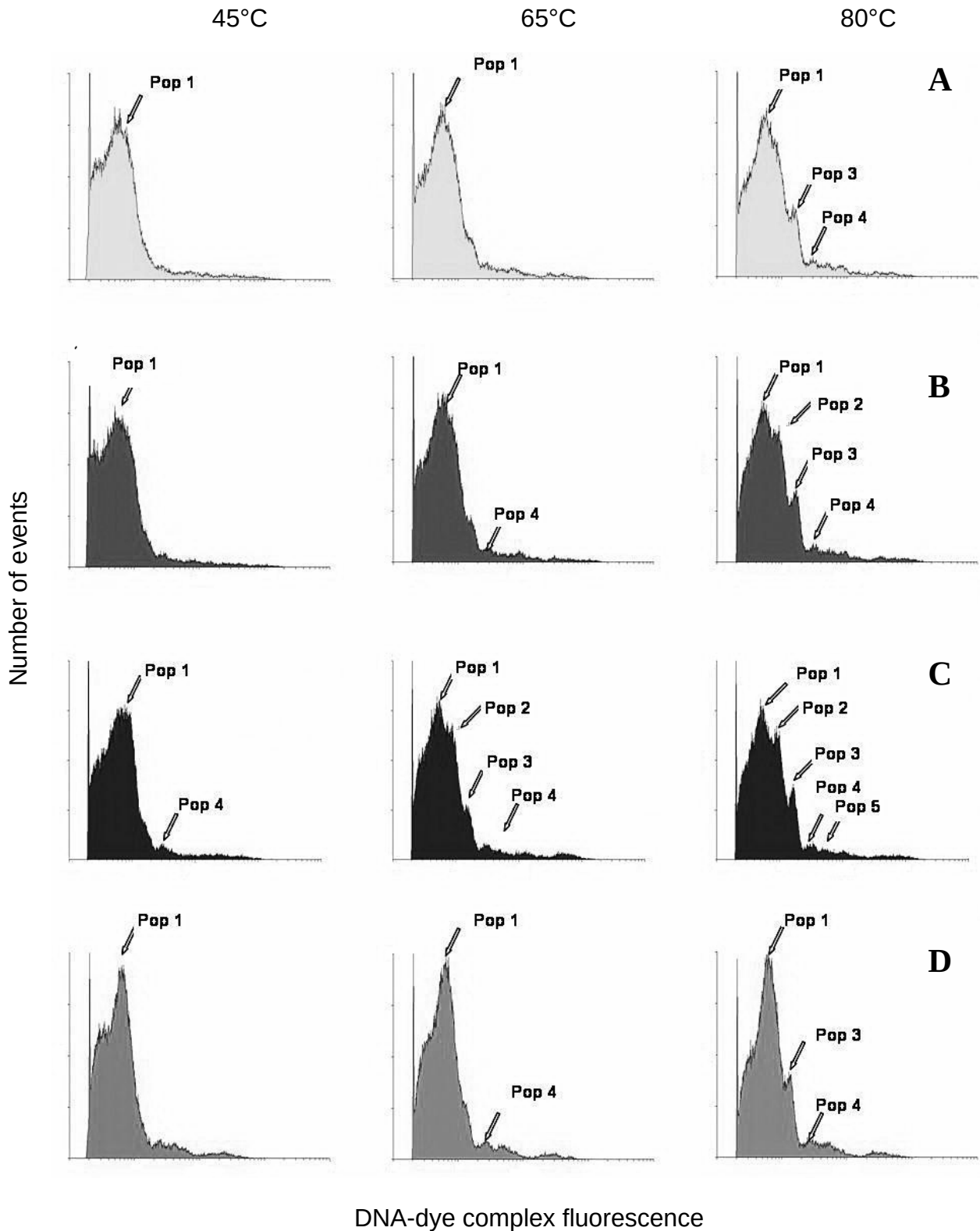


Fig. 3. Histograms of virus distributions showing different populations or groups (Pop). Samples were stained with SYBR Gold at a final concentration of 10^{-4} (A), 5×10^{-5} (B) or 2×10^{-5} (C) or with SYBR Green I at a final concentration of 10^{-4} (D), and incubated at different temperatures (45°C, 65°C or 80°C) for 10 minutes. Exp. 4.

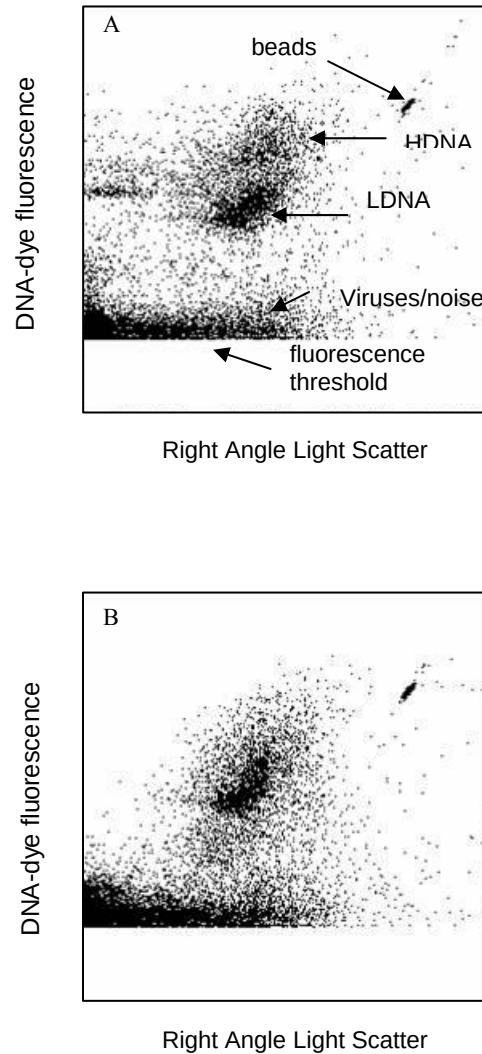


Fig. 4. Typical cytograms obtained for bacterioplankton analysis using 0.2 µm filtered TE (A) or lake water (B) to dilute samples.

Choice of the fixative for FCM counts

Exp. 1 and 2 provided useful data concerning the choice of the fixative for bacterial counts. At t_0 , the smallest numbers of bacteria were recorded for non-fixed samples, whereas the use of fixatives increased significantly the number of detectable bacteria by an average of 14% (Mann-Whitney U test). The highest number of bacteria at this time was obtained with a 1 or 2% final concentration of GA for all buffers. Up to 34% (on average 21%) more bacteria were detected in GA 1% or 2% fixed samples than in fresh ones. From a qualitative point of view, fixing sometimes made it possible to distinguish between different bacterial populations, even in filtered lake water. For virus counts, in exp. 5, we did not observe any quantitative or qualitative difference whether fixing the samples or leaving the sample unfixed (Mann-Whitney U test).

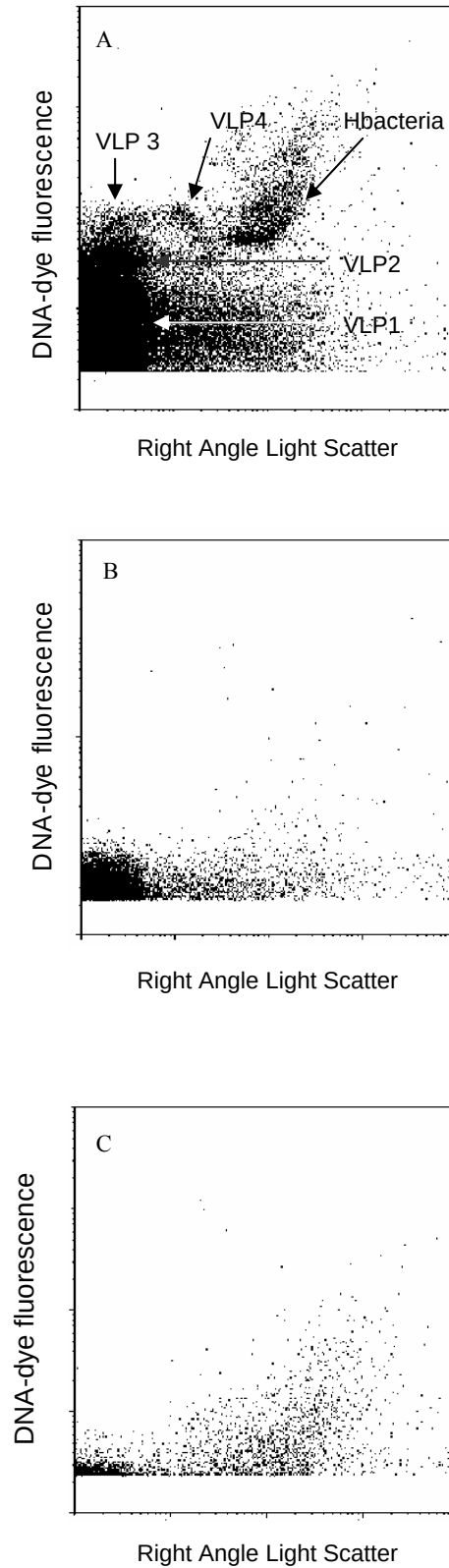


Fig. 5. A: Typical FCM cytogram, representing both the heterotrophic bacterial (Hbacteria) community and different viral populations (VLP) stained with SYBR Gold (10^{-4}). B: Control cytogram with no sample and showing the signature of non-autoclaved 0.02 μm filtered TE stained with SYBR Gold (10^{-4}). C: Control cytogram with no sample, showing the signature of autoclaved and filtered TE stained with SYBR Gold (10^{-4}). Exp. 8.

Storage conditions for FCM counts

For non-fixed samples, a significant increase occurred in bacterial abundance after storing for 8 days at 4°C, with concentrations that could be up to 8 times higher than at t0 (Fig. 6A). At t30, bacterial concentrations were up to 10 times higher than at t0. The small increase at t1 compared to t0 was not significant. At -20°C, abundances decreased in a significant way, *i.e.* at t1 (and at t8), and then at t30 these non-fixed, frozen samples showed a decrease in the initial abundance by about 46% and 66%, respectively. Fig. 6B, referring to the fixed samples, clearly shows that at 4°C a gradual and significant decrease in the initial total bacterial counts occurred from t0 (or t1) to t8, and from t8 to t30, by 23% and 50%, respectively. When stored at -20°C, the concentrations found were significantly lower than those found at t0 for the sets which had been thawed both at t1 and at t30 (-20%). The second frozen set analyzed at t8 did not display any significant change in counts compared to t0 (Fig. 6B). Storage for 40 days in liquid nitrogen increased bacterial abundances by 23% and viral abundances by 22% compared to counts made at t0 (not shown).

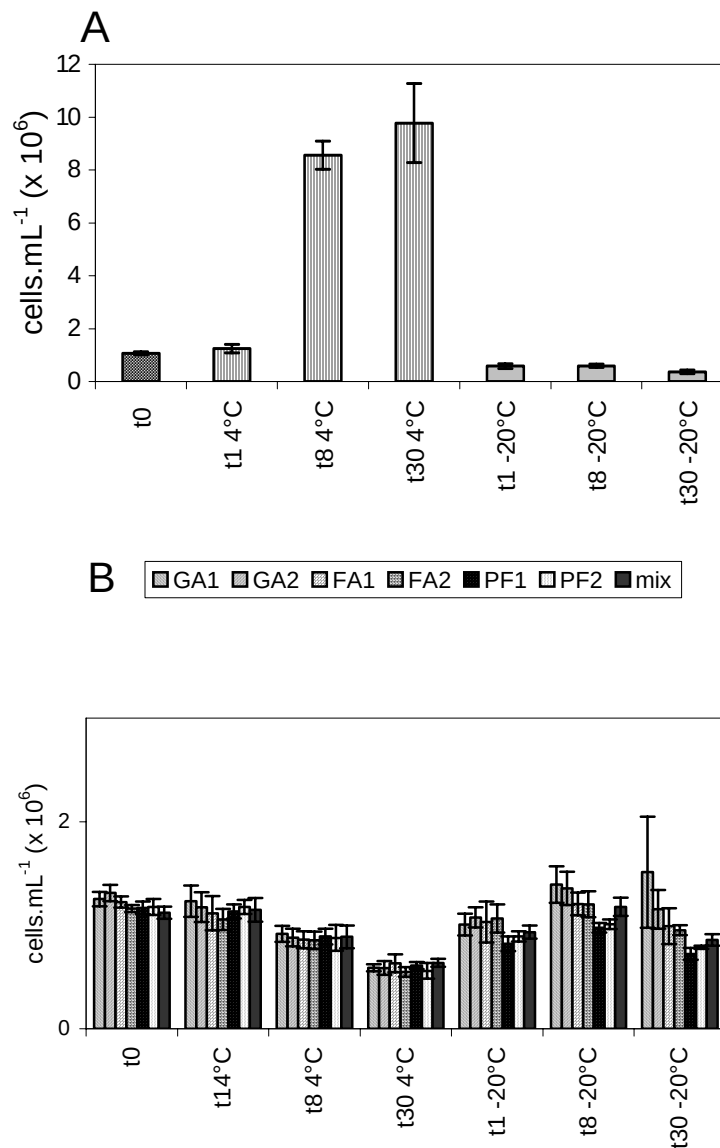


Fig. 6. FCM for bacterioplankton samples. A: Unfixed samples were analyzed at t = 0 (dotted bar) and at t1, t8 and t30 after being stored at 4°C (hatched bars) or -20°C (gray bars). B: Samples fixed with

different fixatives (GA, FA, PF, mix: PF1 and GA 0.05%) and at different concentrations (1 or 2 %) were analyzed at $t = 0$, and at t_1 , t_8 and at t_{30} after being stored at 4°C or -20°C . Exp. 2.

Dye incubation temperature for FCM counts

The results of the incubation temperature experiment for bacterial analyses (exp. 6) have been illustrated in Fig. 7. With unfixed samples, the number of total bacteria detected by FCM decreased significantly by an average of 22% at 80°C , compared to data obtained at 20°C or at 45°C . For heated and unfixed samples, cell losses were on average greater when samples were diluted in lake water. Fixing the samples with either GA 1 or 2% yielded significant higher counts than unfixed samples especially at higher temperatures. The efficiency of detecting GA 1 or 2% fixed cells was not significantly different if they were heated to 45°C or 80°C , except for the samples diluted in lake water and heated to 80°C , for which we found significant lower concentrations. At temperature exceeding 45°C it appeared that samples which were diluted in TE rather than in lake water were more “protected” from overheating and cell destruction.

The results of the incubation temperature experiment for virus samples (exp. 4) have been illustrated in Fig. 3. Temperature was proved to be of great importance in the discrimination and the counting of viruses. 2, 3 and 5 viral groups were detected at 45°C , 65°C and 80°C , respectively. At 65 or 80°C , virus counts were significantly higher (+14%) than those at 45°C . Viral numbers decreased with temperature above 80°C for a same duration of incubation of 10 minutes.

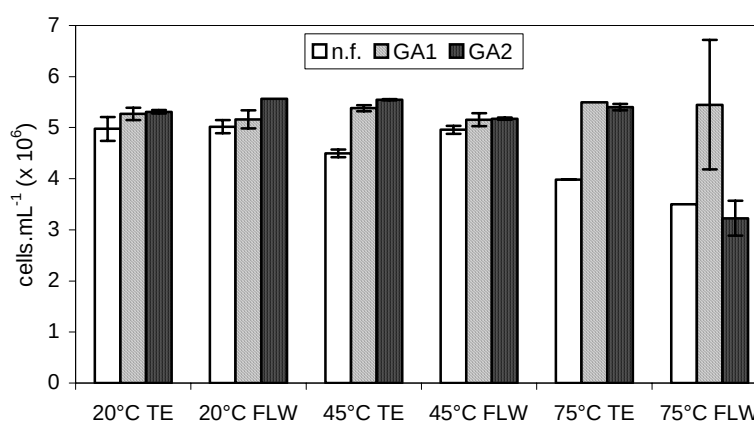


Fig. 7. FCM bacterial counts at $t = 0$. Very similar results were obtained at $t=1$ (not shown here). Error bars represent standard deviations of duplicate counts. The samples were fixed in GA 1 or 2% or not fixed (n.f.), were diluted in 0.02 μm filtered TE or lake water (FLW) and incubated at temperatures of 20°C , 45°C or 80°C . Exp. 6.

EFM counts

Each filter was analyzed both for bacteria and viruses. SYBR Gold and SYBR Green I counts ($n = 28$, $r = 0.87$, $p = 0.99$) were positively correlated and showed no significant quantitative differences. Taking into account all filters, bacterial concentrations found with SYBR Green I and SYBR Gold ranged between $4.28 \times 10^5 - 1.76 \times 10^6$ and $1.84 \times 10^5 - 2.56 \times 10^6$ cells mL^{-1} , respectively. Viral concentrations displayed a range of $1.09 \times 10^7 - 5.43 \times 10^7$ viruses mL^{-1} with SYBR Green I, and of $5.01 \times 10^6 - 5.73 \times 10^7$ particles mL^{-1} with SYBR Gold. At 10^{-3} , SYBR Gold yielded a more stable fluorescence than SYBR Green I. No obvious trend could be discerned related to whether different fixative solutions had been added. As illustrated in Fig. 8, the time for which filters can be kept and still yield reliable

bacterial and viral counts seems to be limited to 1 month. After 16 days, the estimates were similar to those at time zero (immediately after slide preparation). After one month storage, there was an important decrease in abundance, estimated to be of 5% to 98% for viruses and 3% to 73% for bacteria. The decrease in viruses occurred faster than that in bacteria.

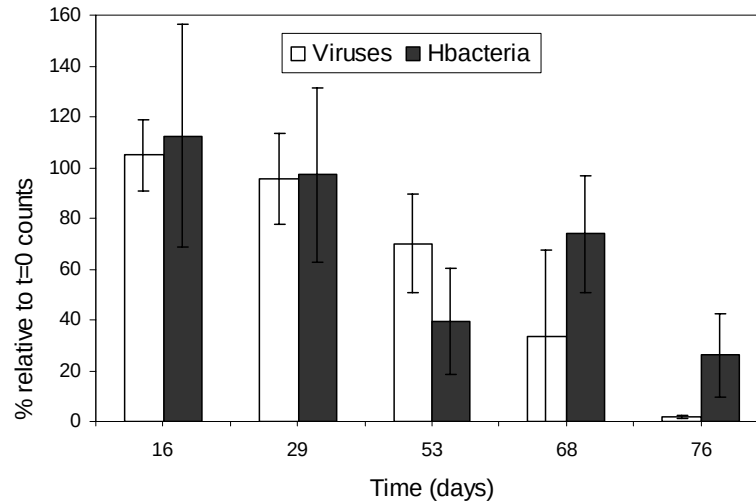


Fig. 8. Percentage of bacterial (black bars) and viral abundances (white bars) determined both by EFM after keeping the sample at -20°C for 16, 29, 53, 68 and 96 days, compared to the values obtained at $t = 0$. Error bars represent standard deviations of different samples ($n = 5$). Exp. 9.

Comparison between FCM and EFM counts

The FCM counts were closely correlated to the EFM counts for both bacteria and viruses (Fig. 9A and B). However, with FCM, bacterial estimates were 54% higher and viruses estimates were 32% higher than with EFM. Bacterial counts obtained using EFM ranged from 4.54×10^5 to 2.88×10^6 (mean 1.19×10^6 cells.mL $^{-1}$), and from 9.48×10^5 to 9.36×10^6 (mean 2.53×10^6 cells.mL $^{-1}$), using FCM. Viral abundances ranged from 5.54×10^6 to 5.71×10^7 (mean 3.36×10^7 particles.mL $^{-1}$) by EFM, and from 2.7×10^7 to 1.32×10^8 (mean 4.96×10^7 particles.mL $^{-1}$) by FCM.

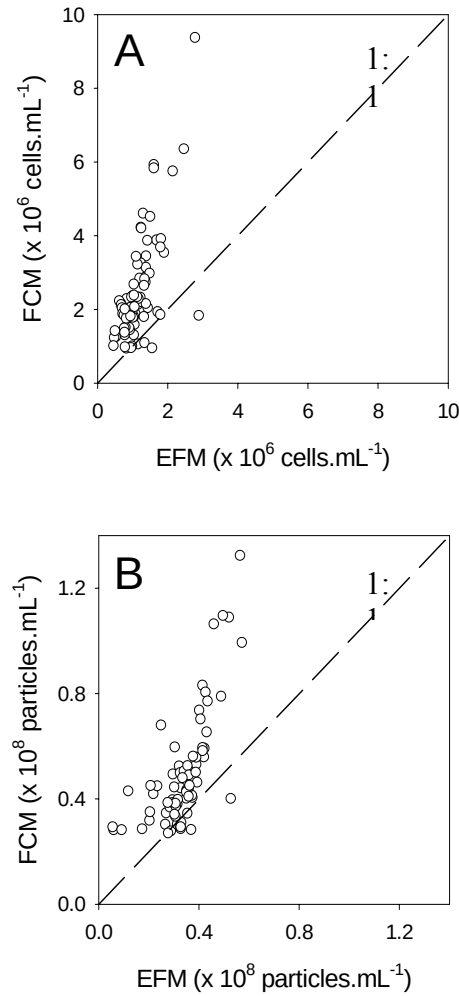


Fig. 9. Relationships between bacteria (A) and viral (B) counts assessed by EFM and by FCM. The dashed lines correspond to the 1:1 relationship. A: $y = 1.50x - 0.0074$ (n = 80, r = 0.7, p = 0.99). B: $y = 2.08x + 0.07$ (n = 80, r = 0.69, p = 0.99). See Methods for the experimental conditions used.

Discussion

FCM analyses

Our results indicate that bacterial and viral counts could be quantitatively and/or qualitatively affected by the type and the final concentration of the fluorescent nucleic acid dye used, the incubation temperature and time, whether fixatives and dilution solutions are used and by the storage condition. Total bacterial counts were highest with SYBR Green I (10^{-4} final concentration) and lowest (40% less) with SYBR Green II (same concentration). These results are not very surprising, as SYBR Green II, unlike the other two dyes tested, preferentially stains single-stranded DNA or RNA, rather than double-stranded DNA, which is the main form present in bacterial cells (indications by the manufacturer). As shown by Lebaron and co-authors (1998b) and by our results, bacterial counts obtained by staining the samples with SYBR Green I were closely correlated to those obtained after staining with SYBR Green II. When the staining efficiency of SYBR Green I (10^{-4}) was compared to that of SYBR Gold (10^{-4} , 5×10^{-5} or 2×10^{-5}), SYBR Green I gave significant higher abundances than SYBR Gold. In addition to the quantitative advantage of using SYBR Green I for

bacterial counts, this stain also provides bacterial signatures, which were easier to interpret (typically with higher fluorescence values). The kinetics experiment showed that SYBR Green I reached maximum bacterial abundances after only a few minutes, and 15 min was a good compromise before FCM analysis. Note that the suitability of using SYBR Green I for rapid enumeration of virus-like particles and bacteria in drinking water was also highlighted by Rinta-Kanto *et al.* (2004). With regard to the dilution solutions, we strongly advise against using FACSFlow or PBS provided by the FCM manufacturer in order to count natural freshwater communities. They both yielded significantly lower bacterial counts than TE, TAE, TBE or filtered lake water (-16%). Interestingly, at t_0 , no quantitative difference was found between the last 4 dilution solutions mentioned above. At t_1 , t_8 and t_{30} , TE and filtered lake water provided 15% higher abundances than TBE or TAE. From a qualitative point of view, TE, TAE and TBE allowed us to distinguish some bacterial subpopulations, typically two groups that had clearly differing DNA-dye fluorescence. These two groups, named HDNA and LDNA or type I and II, had already been reported respectively by Gasol *et al.* (1999) and by Li *et al.* (2001). When samples were diluted in filtered lake water, the signal was generally more compact than when they were diluted in TE, TAE or TBE, likely to be due to the presence of EDTA in the Tris-buffers, which may interact with nucleic acid chains. Sometimes the use of fixatives had a similar effect on the signal, making it possible to distinguish between major subpopulations. One possible explanation for this may be that fixation can sometimes change the refractive index of the cell by affecting the right angle scatter, as well as DNA characteristics and thus fluorescence. At t_0 , regardless of the fixative used, bacterial abundances were 14% higher for the fixed samples than for fresh samples. This has also been reported by Marie *et al.* (1999b).

Generally speaking, fixatives are used to avoid the occurrence of significant changes in the cell counts and characteristics over time. Moreover, fixatives (and also heating treatments), may make the cells more permeable, allowing high-molecular weight molecules (such as the specific nucleic acid stains) to penetrate the cells more quickly and easily (Lebaron *et al.*, 1998b; Marie *et al.*, 1999b). We tested some members of the aldehyde family (FA, GA, PF), as they are known to penetrate cells rapidly, because of their relative low molecular weights (Hayat, 1970; Xenopoulos & Bird, 1997). FA is known to crosslink proteins within the cell membrane, and to influence cell morphology (Vaulot *et al.*, 1989; Noble, 2001). PF is the polymerized form of FA and unlike FA, PF lacks crosslinking characteristics (Marie *et al.*, 1999b). If fixation affects the cell morphology, the forward angle scatter which is related to the size of the cells may also change, thus modifying the signal recorded by FCM (Navaluna *et al.*, 1989). GA is usually used in electron microscopy studies, as the cell shape is little changed even if the stain produces cross links with cell proteins (Vaulot *et al.*, 1989). In our study, GA used at a final concentration of 1 or 2% seemed to be the most appropriate type of fixative. When unfixed or fixed samples were stored at 4°C, abundances found at $d = 1$ were found to be similar at t_0 , suggesting that analysis could be postponed by one day (see also Jacquet *et al.*, 1998). At 4°C and in unfixed samples, counts dramatically increased between t_1 and t_8 , indicating a rapidly-growing community despite the low temperature. At -20°C, these unfixed samples showed an undoubted decrease in counts of about 46% and 66% after 1 day and 1 month of storage, respectively. One hypothesis is that, at very low temperatures and without a gradual temperature decrease, unfixed cells encounter physical problems (*e.g.* intracellular freezing) that result in cell damage. These considerations obviously lead us to discourage the storage of unfixed samples. But what if the samples have been fixed? At 4°C, we detected a loss of total abundance at t_8 and t_{30} by 23 and 50% respectively; no loss was detected at t_1 . When fixed samples were stored at -20°C, we noticed that the concentrations for the sets which have been thawed at t_1 and at t_{30} were significantly lower (by 20%) than the values at t_0 . Generally speaking, a loss in cell numbers may be due

to several factors, such as attachment to the wall of the recipient or burst due to virus infection (Turley & Hughes, 1992). Cells may encounter uninhibited enzyme activity (Gundersen *et al.*, 1996) causing cell dissolution, or cells may break due to inappropriate physical (temperature) or chemical (fixation) conditions. Gundersen *et al.* (1996) suggested that major bacterial losses may occur as a result of uninhibited protease activity, even in fixed water samples. They found bacterial losses of 5% and 50% after 9 and 29 days of storage respectively at -20°C for samples fixed with 2.5% GA. Brussaard (2004) demonstrated that a one month storage at 4°C or -20°C of samples fixed in 0.5% GA led to considerable reductions of viral abundance. Her findings must also be applicable to the storage of bacterioplankton samples. Turley & Hughes (1992) also reported a significant decline in bacterial counts when they analyzed bacterioplankton samples fixed in 1% GA and which had been stored at room temperature – cell numbers were down to 39% of the initial counts prior to storage. Trousselier *et al.* (1995), comparing the effects of low-temperature storage (5°C or -196°C) on GA, FA, PF bacterioplankton and picophytoplankton cells, found that low but positive storage temperatures resulted in significant and rapid reductions in the total cell count. A recent study (Wen *et al.*, 2004) has demonstrated the rapid decline in viral numbers over time of viral isolates preserved in aldehyde fixatives (0.5% GA or 2% FA) at 4°C. In their study, viral abundances had decreased by 72% after 16 days. The use of both fixation and rapid freezing in liquid nitrogen may circumvent problems mentioned above by preventing severe loss of abundance (Brussaard, 2004). In our study (exp.7) storage at -80°C following freezing in liquid nitrogen, provided on average 22% higher bacterial counts compared to counts made at the date of sampling by using the best protocol we found here.

In the case of virus counts, the results were somewhat difficult to interpret. When comparing the virus detection efficiency by adding SYBR Green I at a final concentration of 10^{-4} or adding SYBR Gold at a final concentration of 10^{-4} , 5×10^{-5} or 2×10^{-5} , we found that abundances were greatest with SYBR Gold, regardless of the concentration of the stain. The quantitative results were slightly different, if each experiment was considered separately. It appears that at 80°C, SYBR Green I (at a final concentration of 10^{-4}) compared to SYBR Gold (at the three concentrations) incubations, underestimated virus concentrations by 20%, 33% or 35%, respectively. This higher efficiency of SYBR Gold was found at all the incubation temperatures tested (from 45°C to 80°C). Qualitatively, virus populations could be counted more easily when SYBR Gold stained, as the particles yielded higher fluorescence separating them from the low fluorescence background noise of the machine. SYBR Gold also made it possible to distinguish more viral subpopulations if used at low concentrations. The preferential use of low concentrations of SYBR Gold is especially interesting, since SYBR Gold is clearly cheaper than SYBR Green I. Recently, Brussaard (2004) tested increasing concentrations of SYBR Gold and SYBR Green I on FCM virus counts, and demonstrated that higher virus counts were obtained by staining the sample with SYBR Green I than with SYBR Gold. She recommended a final concentration of the SYBR Green I stock solution of 5×10^{-5} . However this study was mainly performed using several representatives of different virus families easily distainable with FCM (and individual populations may react very differently) rather than on natural samples, as in our study. Consistently with her study, we also found that the incubation temperature is very important in order to boost and correctly assess the viral abundance. At low temperatures, there was a significant reduction, and thus a clear underestimation of the total counts. Taking into account all the dyes and concentrations, we can see that the mean abundances increased significantly by 14% when the temperature was increased from 45°C to 65°C, but there was no significant increase from 65°C to 80°C. It is recognized that heating treatments increase the penetration of the stains by increasing the permeability of the viral capsid and by denaturing the nucleic acids, which may enhance their staining (Xenopoulos & Bird, 1997; Marie *et al.*, 1999a). Moreover, our study also

demonstrated that a higher incubation temperature increased not only the total number of viruses, but also the number of viral subpopulations. It seems that the heat could enhance the “detectability” of different groups of viruses, which might otherwise be invisible because not permeable to the stain. In our study we detected up to 5 different viral populations within the same sample. Analogous to our findings, Chen *et al.* (2001), revealed the existence of at least four viral subpopulations in a sample from Lake Erie. Larsen *et al.* (2004) also reported the detection of 4 different groups in Raunefjorden (Norway). With regard to the use of dilution solutions, it appeared that no differences were obtained, regardless of whether TE, TBE or filtered lake water was used. Brussaard (2004) obtained the highest viral counts when diluting with TE or Tris buffer, and the lowest counts when using distilled water or seawater. We agree that TE is the optimum dilution solution, at least because TE allowed us to differentiate between several subpopulations of viruses. Moreover, regardless of whether the TE buffer had been filtered at 0.02 μm or 0.2 μm , if it was autoclaved, a 30% overestimation of low fluorescence populations, and thus of the total count, could be prevented by removal of the background noise in the critical part of the cytogram. As indicated by Brussaard (2004), over the range tested (between 7 and 8), the pH did not have any influence on the quality of the signature or on the total abundances found. The fixatives tested (GA or FA 1%) did not produce higher final counts of viruses, than unfixed samples. Our findings are consistent with the work done by Wen *et al.* (2004), which found no significant difference between viral abundance estimates made with fixed (0.5% GA and 2% FA, final concentrations) samples and unfixed samples, provided that the slides were prepared immediately. Brussaard’s study (Brussaard, 2004) showed, firstly, that there was no significant difference in the FCM signal of fixed and fresh virus samples for fixing lasting up to 1h and, secondly, no obvious conclusions could be drawn about the use of FA or GA or the best final concentration of the fixative. The two studies indicated above recommended the use of GA at a final concentration of 0.5%, the first one for the reason that occasional reductions in some phytoplankton virus abundances have occurred at higher concentrations. Our study showed that no fixing is necessary if lake water samples are analyzed immediately after their arrival in the laboratory. In addition to this battery of tests, unpublished storage tests performed on some samples stored at 4°C showed that virioplankton abundances had fallen by 40% after being stored for two days. As for bacterial counts, viral counts were higher in liquid nitrogen frozen samples (on average 23%) by comparison to non liquid nitrogen frozen samples. This really questions the meaning of microbial counts after freezing in liquid nitrogen.

EFM counts

At a final concentration of 10^{-3} we found that the fluorescence signal of bacteria and viruses were more stable if they had been SYBR Gold-stained rather than SYBR Green I-stained. These results were in agreement with those presented by Noble (2001) and others indicating that 1) the SYBR Green I signal fades within 30 sec, making it necessary to use an antifading solution or higher concentrations of SYBR Green I in order to increase stability (Noble & Fuhrman, 1998) and 2) that the fluorescence of SYBR Gold stained viruses is stable for more than 2 min without any antifading solution (Chen *et al.*, 2001). Because of the very fast fading of SYBR Green I, Bettarel *et al.* (2000) recommended that this stain should not be used for viral concentrations higher than 10^8 particles ml^{-1} . Wen *et al.* (2004) reported that the suitability of the two stains depended on the sample being analyzed. From a quantitative point of view, we did not observe any significant increase in bacteria or virus counts depending on whether SYBR Gold or SYBR Green I stain had been used. Neither the type nor the concentration of the fixatives tested (GA 0.5 or 1% and FA 1 or 2%) had any influence on EFM estimations. Our investigation showed that the slides can be stored at -20°C for up to one month and still provide reliable and realistic counts. From 29 days to 76 days of storage,

virus counts fell by 5 and 98% respectively, and bacterial counts by 3 and 73% respectively. Noble (2001) proposed to limit the storage of frozen slides to 2-3 weeks, and Wen *et al.* (2004) reported no decline in viral abundance during the 16 days. Furthermore, Turley & Hughes (1992) reported no decrease in bacterial counts of slides counted immediately after preparation of seawater samples and then after being stored, frozen and recounted within 70 days. It is likely that such differences may be related to the chemical characteristics of seawater or lake water, in conjunction with the fixation procedure.

Comparison of FCM and EFM counts

Our data demonstrated that FCM counts were highly correlated to EFM counts, and that FCM counts were generally higher than EFM ones. In our study, FCM counts of bacteria and viruses were 2.13 and 1.47 times higher respectively than the corresponding EFM counts. Another study we conducted on sediment samples confirmed also this trend (Duhamel & Jacquet, 2006). The findings of other authors agree with our findings even if the multiplication factors they found were different, *e.g.* 1.1 for Chen and coworkers (2001) and 1.4 for Marie *et al.* (1999a), both obtained on virus samples. What could contribute to such widely different multiplication factors? We can argue that such differences found between the two techniques can be due to the virus types or bacteria strains, the staining characteristics, etc. A possible explanation of the different factors found for viruses and bacteria could be that viruses are significantly smaller than bacteria, and so the signal is likely to fade very rapidly in EFM. The differences observed between the EFM and FCM counts could also be attributable to a lower accurate estimation by EFM, due to the presence of particles in natural samples, to the fact that fewer cells or biological particles were counted by EFM or to the uneven distribution of the biological entities on the filter (Lebaron *et al.*, 1998a). Moreover, the analysis with EFM is not direct since samples require the need for particle collection. At last, all particles on slides are generally not counted with EFM and assumptions are made to calculate the final concentration. As well as being faster and more accurate (no particle collection or preconcentration steps are required), FCM makes it possible to distinguish between different populations. The viral and bacterial dynamics were probably more accurately revealed by FCM, which allowed a finer analysis of shifts in abundances due to its higher resolution. More generally, it is clear that FCM is less operator-dependent and less labor-intensive than EFM, but that EFM can provide additional information, such as information about the presence of different morphotypes, especially in the case of bacteria. Finally, only EFM permits bacterial phylotyping, as discriminated by the FISH technique, to date (Glöckner *et al.*, 1996).

Conclusions

The major finding of our study was that no unique and universal method exists to assess reliable counts of natural biological populations and that many factors should be considered before doing that. Our study aimed to investigate a wide range of those factors on natural freshwater communities. Concerning FCM counts for lake bacterioplankton, highest numbers were obtained by fixing the samples with GA at a final concentration of 1 or 2%, and by incubating the sample at room temperature for 15 min with SYBR Green I at a final concentration of 10^{-4} . From both the quantitative and qualitative considerations, we suggest diluting the samples in TE (0.2- or 0.02- μ m filtered). We also suggest that analyses should be done on the same day as sampling, or no more than one day later after conserving the samples at 4°C (Tab. 2).

Table 2 Steps to be considered for inclusion in the analysis of bacterial or viral samples by FCM and EFM. n.n.: not necessary; n.t.: not tested; a: filtered at 0.2- or 0.02- μm .

	FCM		EFM
	Bacteria	Viruses	<i>Bacteria and Viruses</i>
Fixation	GA 1 or 2 %	n.n.	n.n.
Staining with	SYBR Green I (10^{-4})	SYBR Gold (2×10^{-5})	SYBR Gold (10^{-3})
Staining time	15 min	15-30 min	n.t.
Dilution solution	TE ^a (n.n. autoclaved)	TE ^a (autoclaved, pH 7-8)	No dilution
Incubation T ($^{\circ}\text{C}$)	Room temperature	80 $^{\circ}\text{C}$	n.t.
Analyses recommended at	T = 0 (or after 1 day)	T = 0	T = 0-30 days if slides stored at -20 $^{\circ}\text{C}$
Storage	1 day at 4 $^{\circ}\text{C}$	Not reliable	1 month at -20 $^{\circ}\text{C}$

To summarize for FCM counts of freshwater virioplankton, we recommend using SYBR Gold at a low concentration (2×10^{-5}) in order to obtain high viral counts, and at the same time to be able to access the various subpopulations within the community. For the same reason, the incubation temperature should be 80 $^{\circ}\text{C}$, and the dilution solution recently autoclaved and 0.02 (or 0.2)- μm filtered TE buffer adjusted to a final pH of 7 or 8 (Tab. 2). If possible, it is suggested to avoid freezing in liquid nitrogen or at least to propose a way to correct probable over-estimation. Concerning counts done by means of EFM, we recommend that samples should be processed immediately by filtering 1 mL (without dilution), staining the filters with SYBR Gold at a final concentration of 10^{-3} and storing the slides at a temperature of no more than -20 $^{\circ}\text{C}$ for up to one month before counting (Tab.2). We hope that our results will provide useful information for scientists working on similar or comparable ecosystems. Clearly, each investigator will have to try to find the best protocol for the system under study, and always use the same protocol in order to be able to compare results.

Acknowledgments

Ursula Dorigo and Sebastien Personnic were funded by the “Comité Intersyndical pour l’Assainissement du Lac du Bourget” and by the French Research Ministry, respectively. The flow cytometer was funded by l’Institut National de la Recherche Agronomique and l’Université de Savoie. Monika Ghosh is acknowledged for revising the English version of the manuscript.

Table 3 Treatments to which lake water samples were subjected in order to optimize enumeration of bacteria and viruses by flow cytometry and epifluorescence. Microb. Comm.: microbial community; B: bacteria, V: viruses

	Exp1	Exp2	Exp3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
Microb. comm.	B	B	B	B V	V	B	B V	V	V B
Dil. Sol.	TE, TAE, TBE, lake water, FACSFlow, PBS	TE, TAE, TBE, lake water	TE	TE, lake water	lake water, TE TBE	TE, lake water	TE	TE (pH 7 or 8; 0,02 or 0,2 μ m filtered; autoclaved or not)	
Fix. Sol.	Untreated, GA 0,25-1% FA 1-2% PF 1-2%	GA 1-2% PF 1-2% FA 1-2% PF 1% + GA 0,05	GA 2%	GA 1%	GA 1% FA 1% untreated	GA 1, 2% untreated	GA 1%	unfixed	FA 1, 2% GA 0,5-1% untreated
Stor. T	-	-20°C 4°C	-	-	-	4°C	-196°C followed by -80°C versus no storage	-	-20°C
Stor. D.	0	0, 1, 8, 30	0	0	0	0, 1	2 or 45 ?? versus O	0	0, 16, 29, 53, 68, 96
Inc. Dye	SYBR Green I (10^{-4}), II (10^{-4})	SYBR Green I (10^{-4})	SYBR Green I (10^{-4}), Gold (10^{-4})	Sybr Green I (10^{-4}), Sybr Gold (10^{-4} , 5×10^{-5} , 2×10^{-5})	Sybr Green I (10^{-4}), Sybr Gold (10^{-4})	Sybr Green I (10^{-4})	Sybr Green I (10^{-4}) for B and Sybr Gold (2×10^{-5}) for V	Sybr Green I (10^{-4}) Sybr Gold (10^{-4})	Sybr Green I (10^{-3}) Sybr Gold (10^{-3})
Inc.	15 min at 20°C	15 min at 20°C	1-60 min at 20°C	15 min at 20°C (B); 10 min 45°C, 65°C or 80°C, 5 min 20°C (V)	10 min 80°C 5 min 20°C	10 min 20°C, 45°C or 80° and 5 min 20°C	15 min at 20°C (B); 80°C, 5 min 20°C (V)	10 min 80°C and 5 min 20°C	-
Counts	FCM	FCM	FCM	FCM	FCM	FCM	FCM	FCM	EFM

References

- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J. S., Meyer-Reil L.A. & Thingstad F. (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257-263.
- Bergh O., Børsheim K.Y., Bratbak G. & Haldal M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-468.
- Bergström A.K. & Jansson M. (2000) Bacterioplankton production in humic lake Ortrasket in relation to input of bacterial cells and input of allochthonous organic carbon. *Microbial Ecology* **39**, 101-115.
- Berninger U.G. (1991) Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnology and Oceanography* **36**, 139-147.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C., Carrias J.F. & Portelli C. (2003) Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophicity. *Freshwater Biology* **48**, 810-822.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C. & Dolan J. (2004) Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 2941-2951.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C. & Laveran H. (2000) A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2283-2289.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Carrias J.F., Sargos D., Garabétian F. & Lavandier P. (2003) Viral lysis, flagellate grazing potential, and bacterial production in lake Pavin. *Microbial Ecology*, **45**, 119-127.
- Børsheim K.Y., Bratbak G. & Haldal M. (1990) Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 352-356.
- Bratbak G. & Haldal M. (1993) Total count of viruses in aquatic environments. In: *Handbook of methods in aquatic Microbial Ecology* (Eds P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr & J.J. Cole), pp. 135-138. Lewis Publisher, Boca Raton Fla.
- Brussaard C.P.D. (2004) Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1506-1513.
- Brussaard C.P.D., Marie D. & Bratbak G. (2000) Flow cytometry detection of viruses. *Journal of Virological Methods*, **85**, 175-182.
- Chen F., Lu J.R., Binder B.J., Liu Y.C. & Hodson E.R. (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 539-545.
- Dingman C.W. & Peacock A.C. (1968) Analytical studies on nuclear ribonucleic acid using polyacrylamide gel. *Biochemistry*, **7**, 659-668.
- Domaizon I., Viboud S. & Fontvieille D. (2003) Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**, 317-329.
- Duhamel S., Domaizon-Pialat I., Personnic & S. Jacquet S. (2006) Assessing the microbial community dynamics and the role of bacteriophages in bacterial mortality in Lake Geneva. *Journal of Water Sciences* **19**, 115-126.
- Duhamel S. & Jacquet S. (2006) Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **64**, 316-332.
- Ferris M.M., Stoffel C.L., Maurer T.T. & Rowlen K.L. (2002) Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Analytical Biochemistry*, **304**, 249-256.

- Fischer U.R. & Velimirov B. (2002) High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 1-12.
- Fisher M.M., Klug J.L., Lauster G., Newton M. & Triplett E.W. (2000) Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microbial Ecology*, **40**, 125-138.
- Francisco D.E., Mah R.A., Taylor D. & Rabin A.C. (1973) Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Transactions of the American Microscopical Society*, **92**, 416-421.
- Fuhrman J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541-547.
- Gasol J.M., Zweifel U.L., Peters F., Fuhrmann J.A. & Hagström Å. (1999) Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4475-4483.
- Glöckner F.O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Karlheinz T. & Schleifer K.H. (1996) An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**, 403-406.
- Gundersen K., Bratbak G. & Heldal M. (1996) Factors influencing the loss of bacteria in preserved seawater samples. *Marine Ecology Progress Series*, **137**, 305-310.
- Hara S., Terauchi K. & Koike I. (1991) Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(9), 2731-2734.
- Hayat M.A. (1970) *Principles and Techniques of electron microscopy. Biological Applications*. Vol. 1. Van Nostrand Reinhold CO., New York
- Hennes K.P. & Suttle C.A. (1995) Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1050-1055.
- Jacquet S., Lennon J. F. & Vaulot D. (1998) Application of a compact automatic sea water sampler to high frequency picoplankton studies. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 309-314.
- Jochem F.J. (2001) Morphology and DNA content of bacterioplankton in the northern Gulf of Mexico: analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 179-194.
- Larsen A., Fonnes-Flatén G.A., Sandaa R.A., Castberg T., Thyrrhaug R., Rune Erga S., Jacquet S. & Bratbak G. (2004) Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography*, **49**, 180-190.
- Lebaron P., Parthuisot N. & Catala P. (1998a) Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1725-1730.
- Lebaron P., Catala P. & Parthuisot N. (1998b) Effectiveness of SYTOX green stain for bacterial viability assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 2697-2700.
- Lebaron P., Servais P., Baudoux A.-C., Bourrain M., Courties C. & Parthuisot N. (2002) Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **28**, 131-140.
- Lemarchand K., Parthuisot N., Catala P. & Lebaron P. (2001) Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 301-309.

- Li W.K.W. & Dickie P.M. (2001) Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and viroplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry*, **44**, 236-246.
- Lisle J.T., Hamilton W.A., Willse A.R. & McFeters G.A. (2004) Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5343-5348.
- Marie D., Partensky F., Jacquet S. & Vaultot D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 186-193.
- Marie D., Partensky F., Vaultot D. & Brussaard C. (1999a) Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. In J. P. Robinson et al. (ed.), *Current Protocols in Cytometry*. suppl. 10. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 11.11.1-11.11.15.
- Marie D., Brussaard C.P.D., Thyraug R., Bratbak G. & Vaultot D. (1999b) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 45-52.
- Middelboe M. & Glud R.N. (2003) Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnology and Oceanography*, **48**, 1447-1456.
- Navaluna N.A., Perry M.J. & Talbot M.C. (1989) The effects of chemical fixation on some optical properties of phytoplankton. *Journal Plankton Research*, **11**, 15-24.
- Noble R.T. (2001) Enumeration of viruses. In: *Marine Microbiology, Methods in Microbiology* (Eds. J. H. Paul), pp. 43-51. Vol **30**. Academic Press, Florida
- Noble R.T. & Fuhrman J.A. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 113-118.
- Ogden R. & Deborah A. (1987) Methods in Enzymology. In: *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Eds S. L. Berger, & A. R. Kimmel), pp. 75-78. Vol. 152. Academic Press Inc., Orlando, Florida.
- Øvreås L., Bourne D.G., Sandaa R.A., Casamayor E.O., Benlloch S., Goddard V.J., Smerdon G., Heldal M. & Thingstad T.F. (2003) Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, **31**, 109-121.
- Paul M.L., Jiang S.C. & Brose J.B. (1991) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2197-2204.
- Proctor L.M. & Fuhrman J. (1990) Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, **343**, 60-62.
- Rinta-Kanto J.M., Lehtola M.L., Vartiainen T. & Martikainen P.J. (2004) Rapid enumeration of virus-like particles in drinking water samples using SYBR-Green I-staining. *Water Research*, **38**, 2614-2618.
- Schröder D.C., Oke J., Hall M., Malin G. & Wilson W.H. (2003) Virus succession observed during an *Emiliana huxleyi* bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2484-2490.
- Shopov A., Williams S.C. & Verity P.G. (2000) Improvements in image analysis and fluorescence microscopy to discriminate and enumerate bacteria and viruses in aquatic samples. *Aquatic Microbial Ecology*, **22**, 103-110.
- Simek K., Macek K. & Vyhnalek V. (1990) Uptake of bacteria-sized fluorescent particles by natural protozoan assemblage in a reservoir. *Archiv fuer Hybrobiologie Beiheft*, **34**, 275-281.

- Simek K., Pernthaler J., Weinbauer M.G., Hornak K., Dolan J.R., Nedoma J., Mašín M. & Amann R.I. (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellated grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2723-2733.
- Sime-Ngando T. (1997) Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. *Année Biologique*, **36**, 181-210.
- Sime-Ngando T., Bettarel Y., Chartogne C. & Sean K. (2003) The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Research Development in Microbiology*, **7**, 481-497.
- Troussellier M., Courties C. & Zettelmanier S. (1995) Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: fixation and storage effects. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **40**, 621-633.
- Turley C.M. & Hughes D.J. (1992) Effects of storage on direct estimates of bacterial numbers of preserved seawater samples. *Deep Sea Research*, **39**, 375-394.
- Vaulot D., Courties C. & Partensky F. (1989) A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry*, **10**, 629-635.
- Vives-Rego J., Lebaron P. & Neve-von Caron G. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, **24**, 429-448.
- Watson S.W., Novitsky T.J., Quinby H.L. & Valois F.W. (1977). Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**, 940-946.
- Weinbauer M.G. & Rassoulzadegan F. (2004) Minireview: Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, **6**, 1-11.
- Wen K., Ortmann A.C. & Suttle C.A. (2004) Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 3862-3867.
- West C.A., He C., Su M., Swanson S.J. & Mentzer S.J. (2001) Aldehyde fixation and thiol-reactive fluorescent cytoplasmic probes for tracking cell migration. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **49**, 511-518.
- Wilhelm S.W. & Suttle C.A. (1999) Viruses and nutrient cycles in the sea. *BioScience*, **49**, 781-787.
- Wommack K.E. & Colwell R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 69-114.
- Xenopoulos M.A. & Bird D.F. (1997) Virus à la sauce Yo-Pro: Microwave-enhanced staining for counting viruses by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography*, **42**, 1648-1650.

CHAPITRE IV

Dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy

CHAPITRE IV : Dynamique spatio-temporelle des communautés microbiennes des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy

Ce quatrième chapitre a pour objectif de présenter notre analyse de la dynamique des communautés microbiennes en lien avec les principales caractéristiques physico-chimiques des trois grands lacs péri-alpins. L'étude de la dynamique des communautés microbiennes, c'est-à-dire le suivi écosystémique (tous les 15 jours en moyenne, entre 0 et 50 mètres de profondeurs) des abondances des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries, des petits eucaryotes hétérotrophes et autotrophes ainsi que des virus, a été réalisé entre juillet 2002 et décembre 2006.

Le suivi des communautés microbiennes entre juillet 2002 et décembre 2003 a permis de rédiger un premier article, présenté dans le paragraphe IV.1 ci-dessous.

Les données obtenues pour les années 2004, 2005 et 2006 sont, quant à elles, exploitées et interprétées dans le chapitre IV.2.

IV.1 ARTICLE II

VI.1.a Contexte de l'étude

Les virus sont une composante ubiquiste du plancton aquatique. Avec des concentrations variant généralement et en moyenne entre 10^6 et 10^9 part mL^{-1} , ils peuvent être responsables d'une part très importante de la mortalité bactérienne et phytoplanctonique (Castberg *et al.* 2002, SimeNgando *et al.* 2003, Weinbauer 2004) et peuvent aussi potentiellement influencer/modifier la diversité et la diversification des espèces (Wommack & Colwell 2000, Weinbauer & Rassoulzadegan 2004, Jiang & Paul 1998, Clokie *et al.* 2003, Mann *et al.* 2003). Notons également que la lyse virale des bactéries et du phytoplancton peut être une source très importante de matière organique dissoute (Middelboe & Jorgensen 2006). Dans chaque écosystème, le rôle fondamental des virus conditionné par leur pouvoir infectieux est déterminé par les paramètres physico-chimiques de l'environnement mais également par la quantité de virus et de cellules hôtes présentes (Murray & Jackson 1992, Wilson & Mann 1997). Ainsi les bactériophages (virus de bactéries hétérotrophes) et les cyanophages (virus infectant les cyanobactéries) sont susceptibles d'être très largement

prépondérants, du point de vue quantitatif et fonctionnel au sein de la communauté virale (Paul & Jiang 2001, Hambly & Suttle 2005). Depuis que Cochlan *et al.* (1993) ont démontré la nécessité de comprendre la répartition spatio-temporelle des virus en relation avec la distribution des bactéries et du phytoplancton, seulement quelques études ont étudié conjointement et de manière fine la dynamique des virus, des bactéries et du petit phytoplancton (Bratbak *et al.* 1990, Rodriguez *et al.* 2000, Jacquet *et al.* 2002, Vrede *et al.* 2003, Anesio *et al.* 2004 Larsen *et al.* 2004, Goddard *et al.* 2005).

VI.1.b Objectifs de l'étude

Le premier objectif de notre étude a été de suivre la distribution des virus, des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries et des petits eucaryotes autotrophes au sein des trois grands lacs péri-alpins. Ces communautés ont été dénombrées par cytométrie en flux entre juillet 2002 et décembre 2003 avec une fréquence d'échantillonnage bi-mensuel. Elles ont été suivies entre 7 et 8 profondeurs (selon les lacs) depuis la surface jusqu'à 50 mètres de profondeur. Le second objectif de l'étude a été de décrire la dynamique des différentes communautés en regard de l'ensemble des interactions biotiques et abiotiques potentielles au sein de chaque écosystème.

VI.1.c Principaux résultats obtenus

Les résultats obtenus ont permis de décrire pour la première fois la distribution et la dynamique du virioplancton en lien avec les principales caractéristiques biologiques, physiques et chimiques des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy. En résumé, il ressort de notre étude :

- la mesure d'un plus grand nombre de virus et de bactéries hétérotrophes dans les écosystèmes riches en nutriments (le Léman et le lac du Bourget) et d'un plus grand nombre de picocyanobactéries dans le lac oligotrophe (Annecy) ;
- la discrimination par cytométrie en flux de plusieurs groupes viraux (jusqu'à 4) dont surtout les VLP1 (Virus-Like Particles 1) et les VLP2 (Virus-Like Particles 2) toujours présents et statistiquement corrélés aux bactéries hétérotrophes pour les premiers et à la chlorophylle *a* et aux picocyanobactéries pour les seconds. Les résultats suggèrent donc fortement que les VLP1 soient majoritairement des bactériophages et les VLP2 majoritairement des cyanophages ;

- la possibilité d'une action virale lytique très importante, notamment en automne, pouvant mettre fin aux fortes abondances des bactéries hétérotrophes enregistrées à cette période dans les trois lacs, suggérant donc ici un phénomène indépendant du statut trophique ;
- l'observation des plus grandes valeurs de VBR (ratio entre virus et bactéries pouvant être >100) jamais rencontrées dans la littérature ;
- l'observation et la séparation de périodes clefs dans l'organisation des relations entre les communautés microbiennes par analyse en composante principale (voir l'article).

Nous avons donc pu mettre en évidence des spécificités biologiques en lien avec le statut trophique des lacs, mais également des variations saisonnières (température) et spatiales (profondeur) qui ont été bien plus importantes que les différences liées au statut trophique, pour diriger et influencer la dynamique des communautés microbiennes. L'analyse des variations du VBR a également confirmé ces résultats. Les variations du VBR ont été largement supérieures aux variations engendrées par le statut trophique permettant de supposer une forte saisonnalité dans la production virioplanctonique et donc de son rôle régulateur.

Au cours de cette étude, il est donc apparu très clairement que les virus puissent jouer un rôle prépondérant sur le fonctionnement du réseau trophique microbien, et que, par conséquent il est nécessaire de tenir compte de ce compartiment biologique pour une meilleure compréhension de l'écologie du plancton des lacs péri-alpins (et plus généralement dans les milieux lacustre) dans le cadre du suivi général de la qualité des eaux de ces lacs.

Seasonal and spatial variability of virio-, bacterio- and picophytoplankton in three peri-alpine lakes

Freshwater Biology (En révision)

Sébastien PERSONNIC^{*}, Isabelle DOMAIZON⁺, Ursula DORIGO^{*}, Stéphan JACQUET^{*}

^{*} *INRA, UMR CARTEL, Station d'Hydrobiologie Lacustre, Equipe d'Ecologie Microbienne Aquatique, 75 avenue de Corzent, 74203 Thonon cedex, France*

⁺ *Université de Savoie, UMR CARTEL, Equipe d'Ecologie Microbienne Aquatique, 73376 Le Bourget du Lac cedex, France*

To whom correspondence should be addressed

jacquet@thonon.inra.fr

Tel: +33 4 50 26 78 12

Fax: +33 4 50 26 07 60

Keywords: viruses, bacteria, flow cytometry, lake, trophic status

Running head: Microbial community dynamics in peri-alpine lakes

Summary

1. Viruses are ubiquitous components of aquatic plankton comprising typically 10^5 to 10^9 part mL^{-1} , causing a significant fraction of microbial mortality, and potentially mediating the outcome of species competition. Viruses are also thought to play important roles in horizontal gene transfer through transduction and may thereby affect bacterial phylotype and diversification. At last, viral lysis of bacteria and phytoplankton may be an important source of Dissolved Organic Matter (DOM), and the virus-mediated regeneration of DOM can affect the cycling of carbon and nutrients. Despite these crucial roles attributed to viruses, still little is known on viral dynamics in lacustrine systems.

2. Analytical Flow cytometry (FCM) was used to assess microbial community dynamics in three natural large and deep lakes, *i.e.* Annecy (oligotrophic), Bourget and Geneva (mesotrophic). Picocyanobacteria, small eukaryotic autotrophs, heterotrophic bacteria and viruses were studied in the 0-50 m surface waters in order to highlight the impact of both physical and chemical parameters as well as biotic interactions on the functioning of microbial communities.

3. Some specificities were recorded according to the trophic status of each ecosystem such as the higher number of viruses and heterotrophic bacteria reported in nutrient-rich environments (*i.e.* Lakes Geneva and Bourget), or the higher abundance of picocyanobacteria in the oligotrophic Lake Annecy. Both seasonal (temperature) and spatial (depth) variations were comparatively more important than the trophic status in driving the microbial communities' dynamics in these three lakes. Principal component analysis allowed us to observe and separate key periods in microbial communities' organisation.

4. As regards heterotrophic bacteria regulation, a strong viral termination of bacterial "blooms" occurred each autumn for each lake. FCM analyses allowed discriminating several viral groups. Among them, VLP1 (Virus-Like Particles 1) and VLP2 (Virus-Like Particles 2) were always observed and significantly correlated to bacteria for the former and chlorophyll *a* and picocyanobacteria for the latter, suggesting that most of VLP1 and VLP2 could be bacteriophages and cyanophages, respectively. VBR (virus to bacteria ratio) was among the highest reported in the literature. The magnitudes of seasonal variations in VBR were largely higher than the magnitude of theoretical variations due to the trophic status, suggesting a strong seasonality in virioplankton production.

5. Overall, these results provide a new evidence of the potential role played by viruses in the functioning of the microbial food webs and our study highlights the importance to

consider further this biological compartment for a better understanding of plankton ecology of Lake Annecy, Bourget and Geneva.

Introduction

During the past two decades, the emergence of epifluorescence microscopy and flow cytometry, combined with the development of highly efficient nucleic acid dyes, have considerably increased our knowledge of micro-organisms, by providing relatively quick, easy, and accurate methods for determining their abundances (Courties *et al.*, 1994; Marie *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2004). These techniques have also played an essential role in the detection and quantification of free viruses in the water column (Xenopoulos & Bird, 1997; Noble & Fuhrman, 1998; Marie *et al.*, 1999; Brussaard, 2004), and in sediments (Danovaro *et al.*, 2001; Duhamel & Jacquet, 2006). Autotrophic and heterotrophic aquatic microorganisms (mainly comprised between 0.2 and 200 μm in size) play important roles at the base of aquatic food webs (Azam *et al.*, 1983; Hagstrom *et al.*, 1988), and in the flow of matter and energy within ecosystems (Stokner & Antia, 1986). However, simultaneous explorations of the dynamics of the various functional groups, such as heterotrophic bacteria, picophytoplankton, and viruses are still rare (*e.g.* Goddard *et al.*, 2005), and have usually been performed in marine ecosystems (Vrede, Stensdotter & Lindström, 2003; Anesio *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2004).

Within the microbial loop, the primary producers constituted by the autotrophic picoplankton (APP) assemblage (0.2-3 μm), which consists of picocyanobacteria and eukaryotic autotrophic plankton (EAP), have been shown to be a major component of planktonic organisms in both freshwater and marine systems (Stockner & Antia, 1986; Waterbury *et al.*, 1986). Picocyanobacteria are usually the dominant group within APP, and they consist mainly of Phycoerythrin rich- and/or Phycocyanin rich-*Synechococcus* (or *Cyanobium*) cells, in both marine (Johnson & Sieburth, 1979; Waterbury *et al.*, 1979; Caron Pick & Lean, 1985; Waterbury *et al.*, 1986) and fresh water systems (Stokner & Antia, 1986; Callieri & Stockner, 2002). This picocyanobacterial group may have a competitive advantage over larger phytoplankton in oligotrophic systems (Schallenberg & Burns, 2001) because of their higher surface to volume ratio (Raven, 1986), which makes them very efficient at taking up nutrients in a context of low nutrient concentrations (Bell & Kalff, 2001; Jacquet *et al.*, 2002). Picocyanobacteria have also been shown to colonize various spatial niche throughout the water column, as they can grow in a wide range of light wavelengths and intensities (Kana & Glibert, 1987; Partensky, Blanchot & Vaultot, 1999). In freshwater ecosystems, the EAP are sometimes dominant over the picocyanobacteria, particularly below the euphotic zone (Callieri & Stockner, 2002). Some recent studies have reported that the heterotrophic fraction of the eukaryotic picoplankton may be very important in terms of their abundance, diversity and role (Lopez-Garcia *et al.*, 2001; Moon-van der Stray, Wachter & Vaultot, 2001; Lefranc *et al.*, 2005; Lepère *et al.*, 2006; Lefèvre *et al.*, 2006).

Heterotrophic bacteria, with concentrations ranging from 10^5 to 10^8 mL^{-1} , interact with all trophic levels, and play a key role in the control of nutrient fluxes via the mineralization of organic matter. Depending on the trophic state and season, bacteria may re-mineralize from 20 to 60% of the carbon fixed by phytoplankton primary production (Cole Findlay & Pace, 1988; Simon *et al.*, 1998). Several studies have shown that bacteria generally follow phytoplankton blooms, triggering bacteriophage abundances as bacteria proliferate.

The high abundance of viruses (on average 10^6 to $10^9 \text{ part.mL}^{-1}$), and their main functional roles (as agents of host organisms mortality and of genetic transfer) have led to the development of the concept of the viral loop (Bratbak *et al.*, 1992), only 10 years after that of

the microbial loop proposed by Azam *et al.* (1983). Viruses have now been recognized as an active component of the planktonic and microbial food webs in both freshwater and marine systems (Fuhrman, 1999; Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). In addition to the physical and chemical influence of the environment, viral infection depends mainly on the abundance of the viruses and their hosts (Murray & Jackson, 1992). Consequently, bacteriophages (viruses infecting heterotrophic bacteria) and cyanophages (viruses infecting cyanobacteria) are likely to dominate the viral community (Paul & Jiang, 2001; Hambly & Suttle, 2005). As viruses are supposed to kill the most abundant members of the prokaryotic and/or eukaryotic community (Wommack & Colwell, 2000), they probably have a considerable impact on species diversity (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Hence, viral lysis of bacterioplankton, resulting not only in the removal of bacteria and changes in diversity, but also in the release of lysis products, may be an important mechanism by which organic matter is lost from the phagotrophic food web as dissolved organic matter (Bratbak *et al.*, 1990; Wilhelm & Suttle, 1999). Although the need to understand the spatial distribution of viruses in relation to the distribution of bacteria and phytoplankton was pointed out in the early nineties (Cochlan *et al.*, 1993), so far only a few studies have focused on the dynamics of viruses, bacteria, and small phytoplankton (Bratbak *et al.*, 1990; Rodriguez *et al.*, 2000; Jacquet *et al.*, 2002; Vrede Stensdotter & Lindström, 2003; Anesio *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2004; Goddard *et al.*, 2005). In this study, for a year and a half we studied the distribution of viral, bacterial and small phytoplankton communities in the surface waters (0 to 50 m depth) of the three largest French and/or occidental natural lakes: Lake Annecy (oligotrophic), Bourget and Geneva (mesotrophic). Our main objective was to investigate and understand the dynamics of these microorganisms (especially viruses) and the existing relationships between these communities and their biological, chemical, and physical environments. With this goal in mind, bivariate and multivariate data analyses were used to analyze the relationships and interdependency among the variables and their relative weights.

Methods

Study sites

Lake Geneva is the largest western European lake. It is situated between France and Switzerland at an altitude of 372 m, with an area of 582 km², a maximum width and length of 13 and 72 km respectively, and a volume of 86x10⁹ m³. The quality of the lake water has been monitored uninterruptedly since 1960. Before 1960, Lake Geneva had an oligotrophic status, but it became eutrophic in the 1970-80s. Following restoration programs, it has been reported to be mesotrophic in recent years (P_{tot}=29.5 µg L⁻¹ in 2005).

Lake Bourget is also located in eastern France (Savoie). It is the largest natural French lake situated at an altitude of 232 m, with an area of 44.2 km², maximum width and length of respectively 3.5 and 18 km, and a volume of 3.62x10⁹ m³. This lake suffered from eutrophication until the mid eighties, before an important policy program helped to restore this ecosystem. It can be viewed as having a similar status as Lake Geneva (P_{tot}=31 µg L⁻¹ in 2005).

Lake Annecy is also located in the eastern part of France (Haute-Savoie). It is the second largest lake located entirely within France, with an area of 28 km², a width of 3.2 km, a length of 14.6 km, and a volume of 1.23x10⁹ m³, for an altitude of 447 m. It has been reported to be oligotrophic since the late 1960s (P_{tot}=6.8 µg L⁻¹ in 2005).

Sampling strategy

Samples were collected twice monthly from July 2002 to December 2003 for all three lakes. For Lake Geneva, the sampling station (which is the reference station known as SHL2)

is located over the greatest depth of the largest basin of the lake (309 m). 8 samples were taken per date at depths of 2.5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30 and 50 m. Samples in Lake Annecy were taken at 3, 10, 15, 20, 25, 30 and 45 m in the centre of the largest basin, where the maximum depth is about 65 m. For Lake Bourget, samples were also carried out at the reference station, known as B, located above the deepest point of the lake (*i.e.* 147 m) at the depths of 2, 6, 10, 15, 20, 30 and 50 m.

Physical, chemical, and Chlorophyll a measurements

Concentrations in mg L^{-1} of total phosphorus, orthophosphates (P-PO_4), total nitrogen, nitrates (N-NO_3), ammonium (N-NH_4), silicates (SiO_2), and total organic carbon (TOC) were measured by the chemical laboratory of the Thonon hydrobiological station according to French normalised (AFNOR) protocols (details available at <http://www.thonon-inra-chimie.net/pages/public/analyses.asp>). The temperature ($^{\circ}\text{C}$), dissolved oxygen concentration (mg L^{-1}), and fluorescence-based chlorophyll *a* (chl*a*) concentration (mg.m^{-3}) were determined using a submersible multiparametric probe CTP 90 SST 24610 for Lakes Annecy and Geneva, and using a CTD SBE 19 Seacat profiler Seabird in Lake Bourget. Note that the two CTDs are inter-calibrated every year. The water column transparency was determined using a white, 25-cm diameter Secchi disk.

Flow cytometry analysis

Autotrophic small eukaryotes, picocyanobacteria, heterotrophic bacteria, and viruses were counted using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air cooled laser providing 15 mW at 488 nm. A total of 1,674 samples were analyzed as briefly described below. Viruses were fixed with glutaraldehyde (0.5% final concentration, grade I, Merck) for 30 min in the dark, then diluted in 0.02 μm filtered TE buffer (0.1 mM Tris-HCL and 1 mM EDTA, pH 8), and incubated with SYBR Green I (at a final 5×10^{-5} dilution of the commercial stock solution; Molecular Probes), for 5 min at ambient temperature, followed by 10 min at 75°C , and then another 5 min at room temperature, prior to FCM analysis (based on Brussaard, 2004). Heterotrophic bacterial counts were performed on samples that had also been fixed with glutaraldehyde (0.5% final concentration) for 30 minutes, but the samples were then diluted in 0.02 μm filtered 50-m water sample, and incubated with SYBR Green I (10^{-4} dilution of the commercial stock solution) for 15 min. For photosynthetic-cells (*i.e.* the picocyanobacteria and small eukaryotes) neither fixative nor fluorochrome were used. Analysis was thus made on fresh samples in which we added a suspension of 1- μm beads (Molecular probes). Flow cytometer Listmode files obtained were then transferred and analyzed on a PC using the custom-designed software CYTOWIN (Vaulot, 1989). More details about the FCM analysis and data treatment can be obtained elsewhere (Marie *et al.*, 1999 and 2000). Typical FCM signatures are reported in Figure 1.

Statistical analysis

The normal distribution of the data was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Because not all the variables followed a normal distribution, we applied log transformation to meet the requirements for parametric statistics. Comparisons between the lakes for the different variables were done using a t-test, with a confidence level of 95% ($\alpha=0.05$). Principal component analysis (PCA) was performed on the whole dataset for each lake. The cluster analysis plot was carried out to describe the association of samples, and the principal component variable loading plot was computed. PCA analysis allowed us to identify seasonal and spatial modes of variability for each lake, then, considering consistent periods, we could

compute partial correlation coefficients. The PCA was used as an exploratory technique for each lake. Moreover, taking the pooled datasets from all three lakes together, bivariate analyses were used to describe global relationships between some variables, especially between bacteria and chlorophyll *a* or viruses. We used a linear regression analysis to make comparisons with relationships previously reported in the literature. All statistical analyses were performed using Statistica 6.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

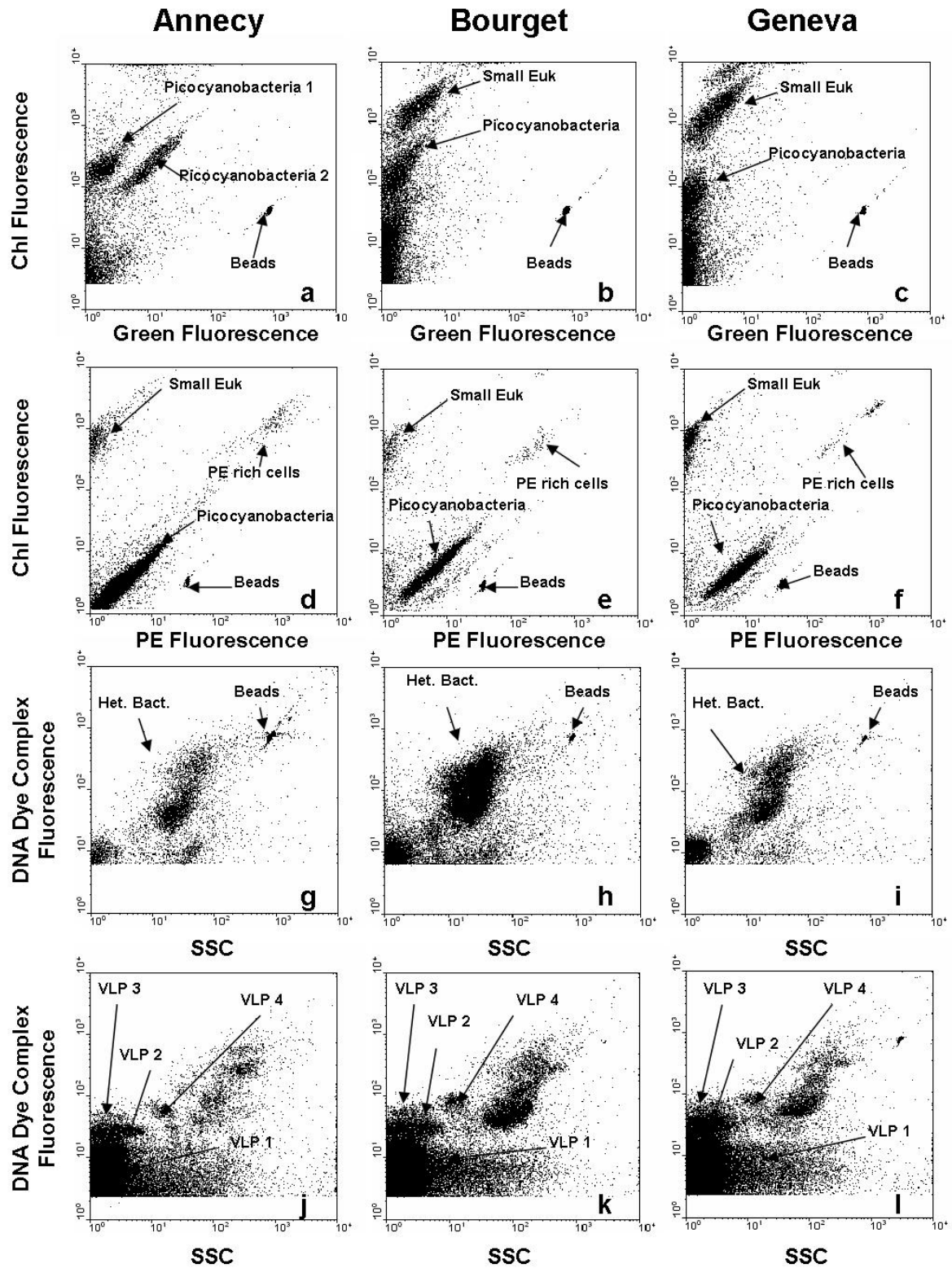


Fig. 1 Typical FCM signatures of the picocyanobacterial (a, b, c), small eukaryotic (d, e, f), bacterial (g, h, i) and viral communities (j, k, l) in the surface waters of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva.

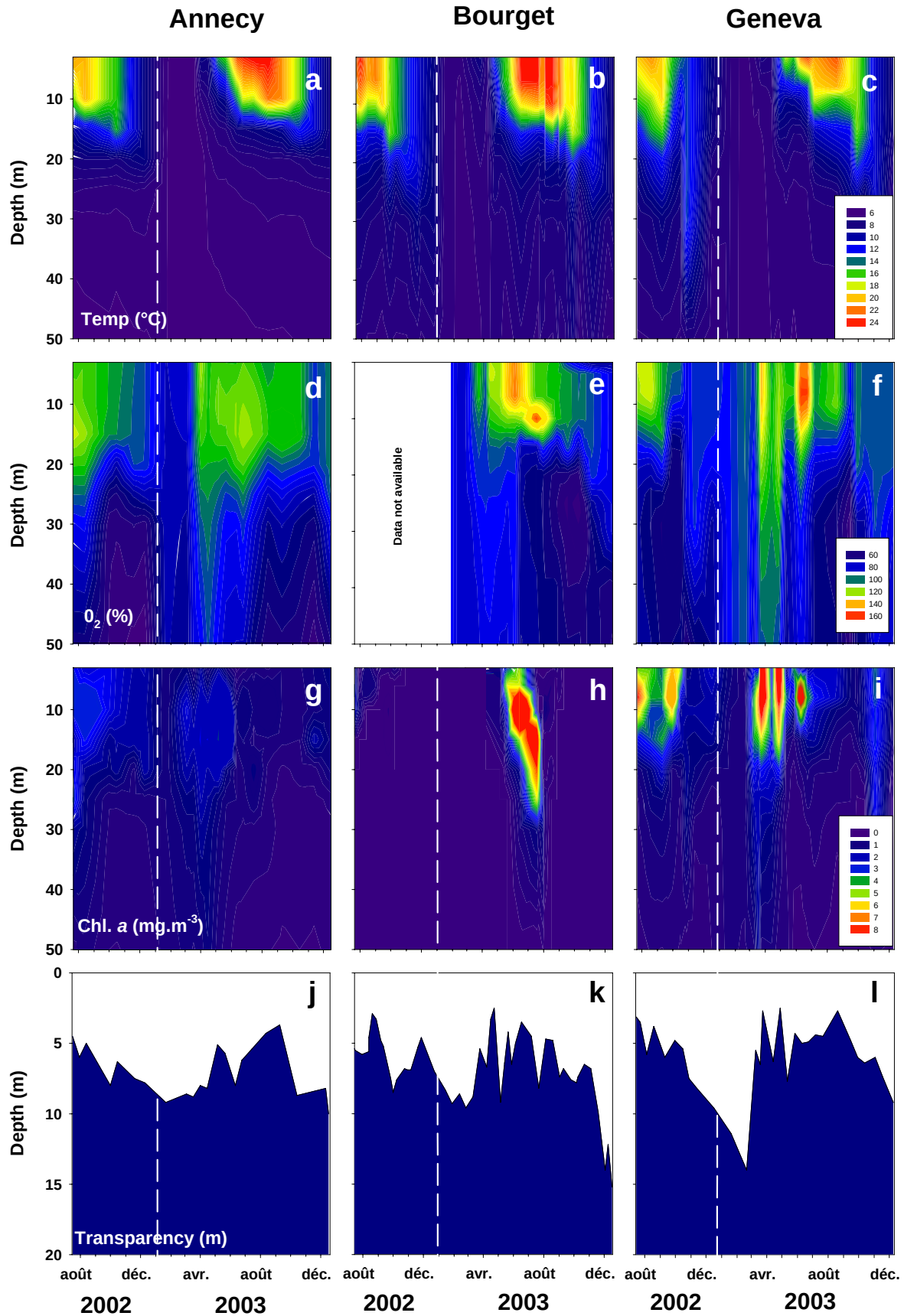


Fig. 2 Time series obtained for water temperature (a, b, c); oxygen saturation (d, e, f); chlorophyll *a* concentration (g, h, i) and transparency (j, k, l) between August 2002 and December 2003 in the surface waters (0-50 meters) of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva.

Results

Physical and chemical environments

Water column stratification occurred from July to September, with a thermocline extending between 10 and 20 meters for Lake Annecy, and between 10 and 25 meters for the other two lakes (Fig. 2a-c). Lower oxygenation concentrations were observed in the deeper water, but there was no marked deoxygenation in the upper 50 m (Fig. 2d-f). The mean and maximum depths of transparency were 7 and 10 m, 6.7 and 15 m, and 6 and 14 m for Lakes Annecy, Bourget, and Geneva, respectively (Fig. 2j-l). In 2003, a short clear-water phase was observed in Lakes Geneva and Bourget in spring, whereas we did not record any similar increase in water transparency during May (*i.e.* the typical period) in Lake Annecy.

The annual cycle of P-PO₄ in Lake Annecy was different from that in the other two lakes (Fig. 3a-c). T tests showed that the mean P-PO₄ concentration measured in Lake Annecy was significantly lower than the values measured in Lakes Bourget and Geneva ($p < 0.001$). The P-PO₄ concentration in Lake Annecy was always below 0.005 mg L⁻¹ in the upper 60 m, except between September and December, when concentrations could reach levels of up to 0.025 mg L⁻¹ (annual mean $\pm$ SD: 0.002 $\pm$ 0.001). The seasonal patterns of P-PO₄ concentration were quite similar in Lakes Bourget and Geneva, with undetectable concentration of P-PO₄ between 0 and 45 m from May to December. However, P-PO₄ increased markedly during the destratification period, from December to April, reaching 0.025 mg L⁻¹ in February and March in these two lakes (annual mean $\pm$ SD: 0.01 $\pm$ 0.001 and 0.01 $\pm$ 0.008 for Lakes Bourget and Geneva respectively).

In contrast with P-PO₄, there was no obvious seasonal cycle in Lake Annecy for the N-NO₃ concentrations which ranged from 0.1 to 0.4 mg L⁻¹. The highest values (*i.e.* 0.4 mg L⁻¹) were measured at depths between 20 and 50 m from October to December 2002, and from July to December 2003. The overall pattern of N-NO₃ levels in Lakes Bourget and Geneva over an annual cycle was similar to that of P-PO₄. For these two lakes, N-NO₃ concentrations ranged from 0.1 to 0.6 mg L⁻¹ (Fig. 3d-f). A t-test revealed that N-NO₃ concentrations were significantly lower in Lake Annecy ($p < 0.001$) than in Lakes Bourget and Geneva.

Similarly, for N-NH₄ concentrations, Lake Annecy also displayed significantly lower concentrations than the other two lakes (Fig. 3g-i). N-NH₄ was generally below 0.01 mg L⁻¹ in the top 50 m of all three lakes. In contrast we observed a deep water N-NH₄ peak between 50 to 60 meters expect in February to July. Two N-NH₄ peaks were recorded in 2003 for both Lakes Bourget and Geneva in spring at around 10-15 m depth. For Lake Bourget a deeper (50-60 meters) water peak was also observed in December 2003.

SiO₂ concentrations ranged from 0.5 to 5 mg L⁻¹, 0.5 to 3.5 mg L⁻¹, and 0.5 to 1.5 mg L⁻¹ in Lakes Annecy, Bourget, and Geneva, respectively (Fig. 3j-l). This nutrient increased gradually with depth, and for all three lakes SiO₂ patterns followed the seasonal water stratification (*i.e.* a decrease occurred throughout the stratification process).

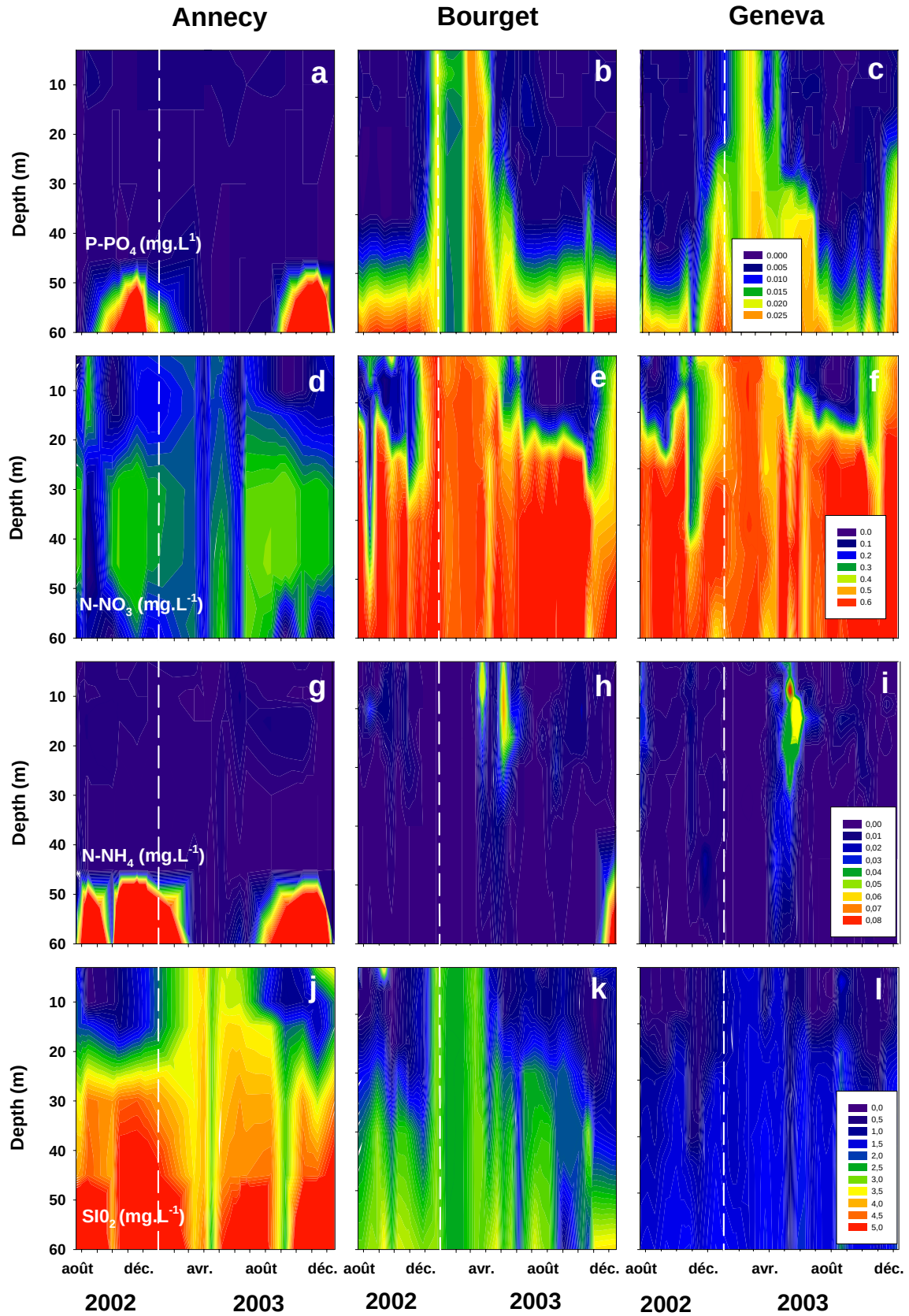


Fig. 3 Time series obtained for data sets for P-PO₄ (a, b, c); N-NO₃ (d, e, f); N-NH₄ (g, h, i) and SiO₂ (j, k, l) concentrations between August 2002 and December 2003 in the surface waters (0-50 meters) of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva.

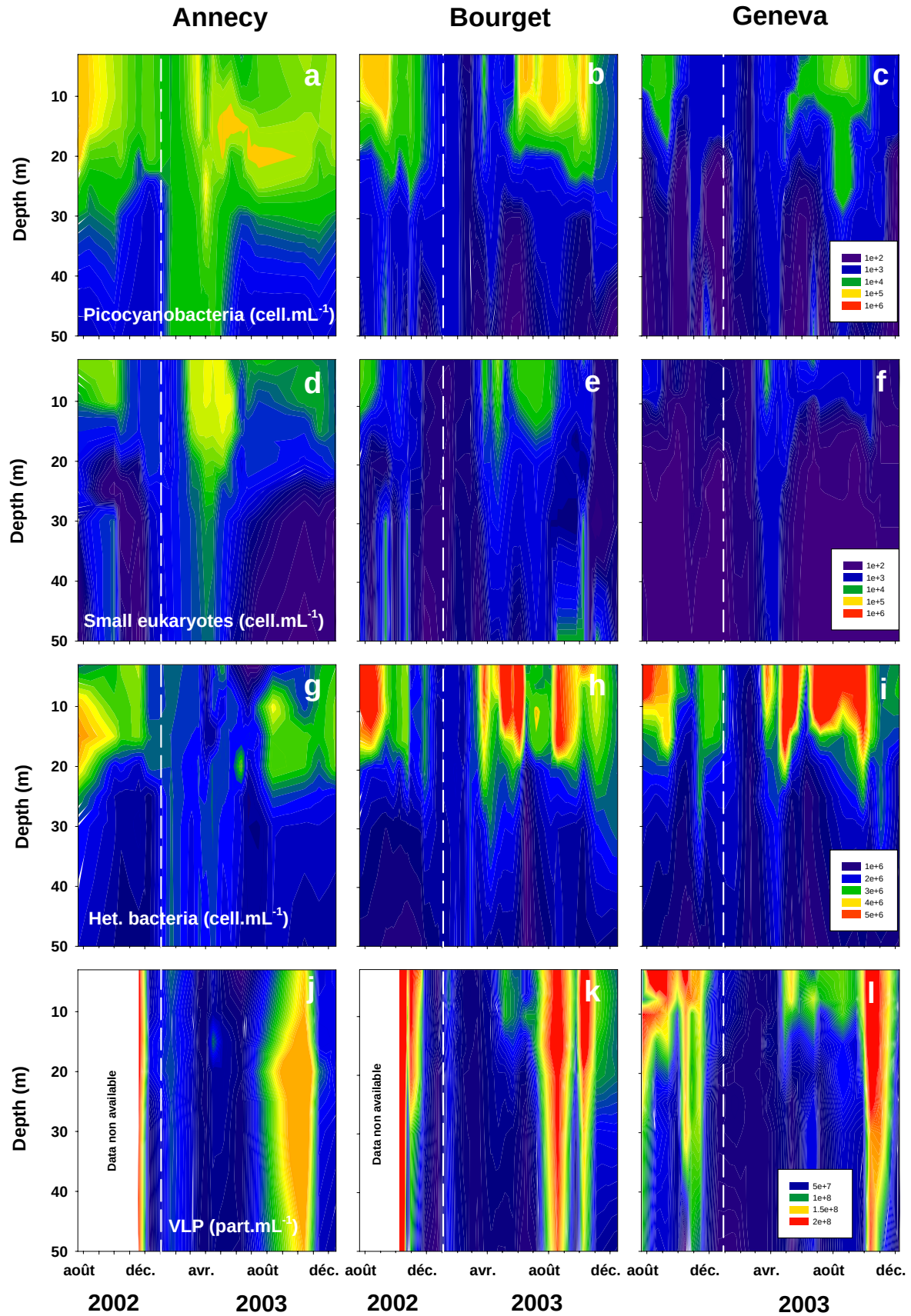


Fig. 4 Development of picocyanobacteria (a, b, c); small eukaryotes (d, e, f); heterotrophic bacteria (g, h, i) and virus like particles (j, k, l) between August 2002 and December 2003 in the surface waters (0-50 meters) of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva.

Distribution and development of the various microbial communities

Chla concentrations ranged from 0 to 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 2g-i), and the maximum for each lake was always obtained during the stratified period and in the top 10-15 meters. For Lake Annecy, concentrations were lower than in two other ecosystems ($p < 0.001$), with values varying between 2 and 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the 0-25 m surface layer during August-September 2002, and from March to June 2003. At the same depths, the Chla concentration reached 3 to 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Lake Bourget (from June to August), and for Lake Geneva (but over a longer period, from August to October 2002 and from March to July 2003).

Picocyanobacterial abundance ranged from 0 to $3 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$, the highest concentrations were always observed in the top 20 m of the water column (Fig. 4a-c). For Lakes Bourget and Geneva, the highest values (3×10^5 and $7 \times 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$ respectively) were recorded during the stratification period, *i.e.* between May and October, in the top 15 meters. For the other months and depths investigated, the mean abundance was $3 \times 10^3 \text{ cells.mL}^{-1}$. The comparison between the three lakes for this community, using a t-test, showed that Lake Annecy had significantly higher picocyanobacterial abundances than Lakes Bourget and Geneva, by a factor of 1.6 and 8.6, respectively ($p = 0.04$ and $p = 0.001$). Moreover, FCM analysis allowed us to identify 2 or 3 distinct populations of picocyanobacteria, but only in Lake Annecy. At least two groups, identified as Picocyano1 and 2, could clearly be distinguished (Fig. 5). The first peak was mainly dominated by Picocyano1, with maximum concentrations of $1.6 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$ in the top 15 meters in May 2003, while the second peak could be attributed to the second group, with $1.5 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$ in May to September 2003, and located deeper down, between 15 to 25 meters (Fig. 5). It is noteworthy that in February, March and April 2003, the highest densities were observed at depths greater than 50 meters.

Pigmented eukaryotes, considered here as a single group, displayed concentrations ranging over three orders of magnitude depending on depth and season (*i.e.* between 7×10^1 to $4.8 \times 10^4 \text{ cells.mL}^{-1}$). The highest concentrations were recorded between 0 and 25 m from March to June 2003 in Lake Annecy, between 0 and 15 m from April to September in Lake Bourget and to a lesser extent between 0 and 15 m from March to July 2003 in Lake Geneva (Fig. 4d-f). The mean abundance of these small, pigmented eukaryotes was significantly lower in Lake Geneva than in the other two lakes ($p < 0.01$).

In Lake Annecy, the highest concentrations of heterotrophic bacteria (3 to $4 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$) were recorded in the top 25 meters from July to December in 2002 and in 2003. In the two mesotrophic lakes, large increases in heterotrophic bacteria abundance were observed in spring, summer, and early autumn (Fig. 4g-i). In Lake Bourget, the heterotrophic bacterial distribution displayed 4 main periods of high bacterial densities with concentrations exceeding $5 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$, in the top 15-20 meters (August 2002, March-April 2003, May-July 2003 and August-October 2003). The same kind of pattern was observed in Lake Geneva where the highest abundances $> 5 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ were also found in the top 15-20 meters (August-September 2002, March 2003, April-May 2003, July to October 2003). On average, the highest bacterial concentrations were observed in Lake Bourget ($2.7 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$), followed by Lake Geneva ($2.6 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$), whereas Lake Annecy ($2.2 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$) had significantly lower heterotrophic bacterial abundances ($p < 0.01$).

FCM allowed us to distinguish at least 2 groups throughout the year. These 2 groups (Fig. 4j-l) were referred to as VLP1 and VLP2 (Virus-Like-Particles, groups 1 and 2). Two other groups were also discriminated clearly but not along a complete year (Fig. 1). The concentration of the most abundant group, VLP1, ranged from 2×10^7 to $2 \times 10^8 \text{ particles.mL}^{-1}$. The concentration of VLP2 was always lower, and ranged from 2×10^6 to $2 \times 10^7 \text{ particles.mL}^{-1}$. Like those of bacteria, the abundances of VLP1 in Lake Annecy were significantly lower than in the two other lakes ($p < 0.01$). In Lake Annecy, viral densities ranged from 2×10^7 to $8 \times 10^7 \text{ particles.mL}^{-1}$, the highest densities being recorded between August and October 2003. In

Lake Bourget, VLP1 abundance reached its three highest values in October 2002, August 2003, and October 2003 respectively, with concentrations exceeding 2×10^8 particles.mL⁻¹ between 0 and 50 meters, whereas the highest abundances of VLP2 (2×10^7 particles. mL⁻¹) occurred only in October (2002 and 2003) between 0 and 20 meters. Similarly, in Lake Geneva, the two highest abundances of VLP1 were recorded in early autumn (October 2002 and 2003), with concentrations exceeding 2×10^8 particles.mL⁻¹ in the top 50 meters. VLP2 viruses reached their maximum densities in late summer and early autumn (August-October 2002 and October 2003), with 2×10^7 particles.mL⁻¹ observed between 0 and 20 meters.

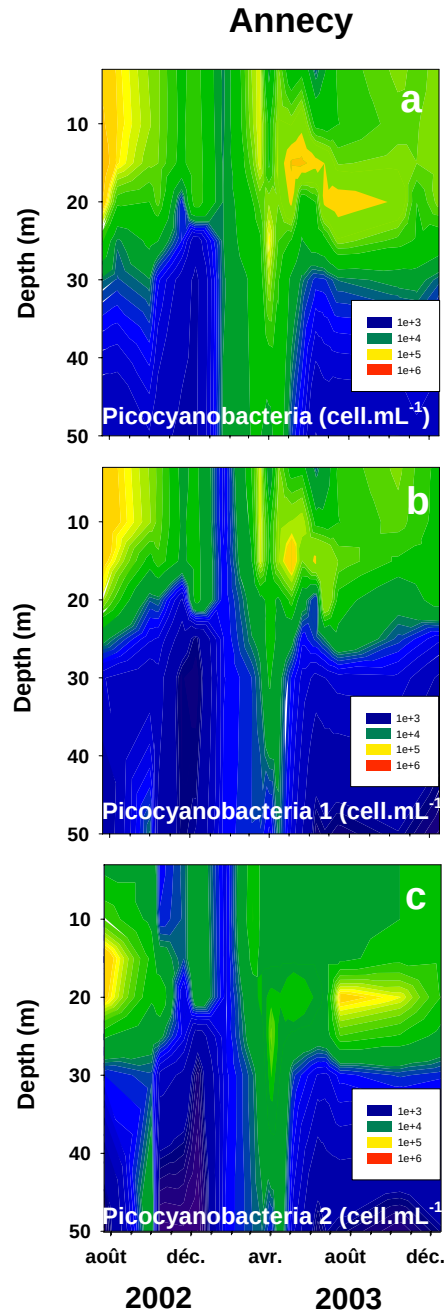


Fig. 5 Development of total picocyanobacteria (a); and of the picocyanobacteria group 1 (b) and group 2 (c); between August 2002 and December 2003 in the surface waters (0-50 meters) of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva.

Relationships between variables

We used the VBR (Viruses to Bacteria Ratio) as a proxy to infer the relationship between viral and bacterial communities (Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). In Lakes Annecy, Bourget, and Geneva, the VBR always indicated the numerical predominance of viruses over bacteria. For each of the lakes, the mean values calculated for each month ranged from 20 to 87 (mean: 36), 15 to 99 (mean: 51), and 16 to 114 (mean: 40), respectively (Tab. 1).

Table 1 Mean and standard deviation values (out of 309 samples) in 2003 of the VBR (virus bacteria ratios) per month for the three lakes

2003	VBR Annecy			VBR Bourget			VBR Geneva		
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n
January	35.6	1.2	7	45.2	11	14	22.8	7.5	8
February	32.8	6	7	25.3	9	14	27.9	3.0	8
March	23.8	6.4	14	15.0	5	14	16.1	5.3	16
April	26.5	16.4	14	20.7	4	14	19.9	6.5	16
May	20.8	9.8	10	21.7	4	14	22.5	7.1	16
June	19.3	4.1	7	27.8	15	14	25.7	11	8
July	24.4	24	14	35.8	7	7	20.8	8.7	8
August	25.4	12.3	7	74.6	39	7	31.8	7.1	8
September	30	7.9	7	27.7	3	7	25.3	7.7	16
October	87.3	23.6	7	98.7	19	7	113.7	36.5	8
November	32.2	8.2	7	34.9	1	7	73.2	2.7	8
December	28.3	8.1	7	37.4	4	7	29.3	3.2	8

Although the highest ratios were found in the two mesotrophic lakes (Bourget and Geneva), statistical analysis did not reveal any significant difference between the lakes. In contrast, clear seasonal changes in the VBR were recorded. The highest ratios were found in early autumn, and a t-test revealed significant differences between VBR values measured in spring, summer, autumn and winter ($p < 0.05$). During summer, and especially during the autumn, the VBR clearly increased. The highest VBR was always observed in October in all three lakes, with high values (> 80) recorded both in 2002 and 2003. Considering the dataset as a whole (all three lakes together), we noted an inverse relationship between the VBR and bacterial abundance ($p < 0.01$, $n = 423$, $r = -0.25$), with the highest VBR values being recorded at times of relatively low bacterial abundance. This has been reported in many studies for both marine and freshwater ecosystems (Maranger & Bird, 1995; Jiang & Paul, 1995). In addition, highest VBR were recorded at depths greater than 20-30 m for the three lakes (Tab. 2). Indeed, between 0 and 20 m, VBR annual mean values were about 29.3, 31.2, and 30.1 in Lakes Geneva, Bourget and Annecy, respectively. These values reached 36.3, 37, 35.4 between 20 and 50 m.

Table 2 Mean and standard deviation values (out of 309 samples) in 2003 of the VBR virus bacteria ratios per depths for the three lakes

VBR Annecy	Mean	SD	n
2m	29.5	16.3	10
6m	27.6	15.3	11
10m	30.6	22.1	11
15m	29.6	18.9	10
20m	33.4	23.0	10

30m	36.4	30.0	10
50m	36.5	28.2	11
VBR Bourget			
3m	29.5	15.2	18
10m	31.7	22.0	18
15m	32.1	21.5	18
20m	31.8	21.3	18
25m	35.7	24.6	18
30m	40.3	33.2	18
50m	40.3	27.6	18
VBR Geneva			
2.5m	28.95	23.40	15
7.5m	28.44	23.35	15
10m	27.51	21.72	15
15m	28.70	22.48	15
20m	33.04	27.59	15
25m	35.07	29.82	15
30m	34.01	23.96	15
50m	43.38	44.69	15

We used linear regression to describe the relationships between bacteria and the other parameters (Tab. 3). Based on the analysis of all the data (for all three lakes), we found a significant linear relationship between bacteria and chlorophyll *a* concentrations (equation 1):

$$(1) \text{Log}[\text{HB}] = 0.331 \times \text{Log}[\text{Chla}] + 14.41 \quad (r=0.378, p<0.01, n=507).$$

We did not find any significant correlation between total viral abundance (VLP) or VLP1 and chlorophyll *a* concentrations. In contrast, VLP2 was observed to be significantly linked to Chla and picocyanobacterial (PC) concentrations (equations 2 and 3):

$$(2) \text{Log}[\text{VLP2}] = 0.28 \times \text{Log}[\text{Chla}] + 15.15 \quad (r=0.197, p<0.01, n=356);$$

$$(3) \text{Log}[\text{VLP2}] = 0.132 \times \text{Log}[\text{PC}] + 14.2 \quad (r=0.311, p<0.01, n=376).$$

Significant relationships between VLP2 and Chla or PC could be confirmed separately for Lakes Bourget and Geneva, but not for Lake Annecy. The abundance of the free viruses was observed to increase with increasing heterotrophic bacterial concentrations (equations 4 and 5), and quite similar relationships were obtained for VLP and for VLP1:

$$(4) \text{Log}[\text{VLP}] = 0.614 \times \text{Log}[\text{HB}] + 9.117 \quad (r=0.461, p<0.01, n=423);$$

$$(5) \text{Log}[\text{VLP1}] = 0.566 \times \text{Log}[\text{HB}] + 9.741 \quad (r=0.423, p<0.01, n=385).$$

Very similar equations were obtained (equations 4 and 5) independently, for each lake (slopes from 0.565 to 0.596 and intercept from 9.361 to 9.876), suggesting that this relationship remains constant from one lake to another. Moreover, although the relationships between Log[HB] and Log[Chla] displayed rather low seasonal variation, those between log[VLP] and Log[HB] did display clear seasonal variations (equations 6 to 9). The highest slope value was found in winter, and the lowest in autumn:

$$(6) \text{Log}[\text{VLP}] = 0.68 \times \text{Log}[\text{HB}] + 7.75 \quad (r=0.461, p<0.01, n=118) \text{ Spring};$$

$$(7) \text{Log}[\text{VLP}] = 0.60 \times \text{Log}[\text{HB}] + 9.51 \quad (r=0.461, p<0.01, n=71) \text{ Summer};$$

$$(8) \text{Log}[\text{VLP}] = 0.49 \times \text{Log}[\text{HB}] + 11.51 \quad (r=0.392, p<0.01, n=109) \text{ Autumn};$$

$$(9) \text{Log}[\text{VLP}] = 0.84 \times \text{Log}[\text{HB}] + 5.67 \quad (r=0.636, p<0.01, n=124) \text{ Winter}.$$

We used principal component analysis (PCA) as an exploratory technique to investigate the dataset obtained for each lake. The three eigenvalues (Tab. 4) accounted for 79.6, 76.7, and 69.1% of the analysis of the data for Geneva, Bourget, and Annecy, respectively.

Table 3 Slope values of the regression equations obtained for significant linear regressions ($p < 0.05$) relating heterotrophic bacteria abundances (cell mL^{-1}), chl *a* concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$), total viruses (VLP), VLP1 and VLP2 abundances (part mL^{-1}), *Synechococcus* abundances (cell mL^{-1}). Values obtained for this study were calculated from data of the 3 lakes.

	Authors	slope (a)	N
Log [Bacteria] = a Log [chl <i>a</i>] +b	Shortreed & Stockner (1986)	0.56	18
	Currie (1990)	0.33	361
	del Giorgio & Peters (1993)	0.27	20
	Tzaras & Pick (1994)	0.24	26
	Gasol Simon & Kalff (1995)	0.30	74
	Gasol Simon & Kalff (1995)	0.59	18
	del Giorgio & Scarborough (1995)	0.32	24
	Zinabu & Taylor (1997)	0.59	52
	Zinabu & Taylor (1997)	0.34	24
	Jeppesen Erlandsen Sondergaard 1997	0.29	>100
	Bouvy <i>et al.</i> (1998)	0.58	93
	This study	0.33	507
Log [VLP] = a Log [Bacteria] +b	Maranger & Bird (1995)	0.16	27
	Guixa-Boixereu (1999)	0.83	149
	Guixa-Boixereu (1999)	0.92	580
	This study	0.61	423
Log [VLP1] = a Log [Bacteria] +b	This study	0.57	385
Log [VLP1] = a Log [Syn] +b	This study	0.15	486
Log [VLP2] = a Log [Bacteria] +b	This study	0.87	417
Log [VLP2] = a Log [Syn] +b	This study	0.13	376
Log [VLP2] = a Log [chl <i>a</i>] +b	This study	0.28	356

Table 4 Eigenvalues, total and cumulative % of variance in the factor analysis.

	Factor	Eigenvalues	% of total variance	cumulative eigenvalue	cumulative %
Annecy	1	3.01	33.43	3.01	33.43
	2	1.88	20.89	4.89	54.32
	3	1.33	14.82	6.22	69.13
Bourget	1	5.14	51.37	5.14	51.37
	2	1.42	14.16	6.55	65.53
	3	1.12	11.16	7.67	76.69
Geneva	1	5.09	50.94	5.09	50.94
	2	1.75	17.54	6.85	68.48
	3	1.11	11.13	7.96	79.61

The first mode of variability for all three lakes was “depth”, which accounted for 50.9, 51.9, and 36.7% of the overall variability for Geneva, Bourget, and Annecy, respectively. The first axis was able to discriminate between the “hypolimnion” and the other depths. This analysis showed a similar association of the parameters on the axis 1 for Lake Bourget and Lake Geneva. This axis opposed, on one hand, “P-PO₄” concentrations and, on the other hand, “temperature-TOC-Picocyanobacteria” which were associated with viruses and bacteria. We noticed the marked impact of the structuring summer stratification characterized by high productivity and the progressive depletion of P-PO₄ concentrations in the epilimnion, whereas the hypolimnic zone remained rich in dissolved nutrients. Interestingly, a different projection was obtained for Lake Annecy. Although the axis reflected the structuring effect related to depth, the projection of the variables was different from that obtained for Lakes Geneva and Bourget. Indeed, P-PO₄ concentrations were associated with high abundances of viruses, heterotrophic bacteria, and picocyanobacteria, highlighting the importance of this element as a limiting factor in the productivity in this lake.

The second mode of variability for all three lakes appeared on axis 2, and made it possible to pick out key periods in the dynamics of the microbial communities in the epilimnion. Different periods could be spotted, and corresponded to specific community structures (Fig. 7), especially in the two mesotrophic ecosystems. Indeed, for Lakes Bourget and Geneva, the PCA made it possible to clearly distinguish an ‘end summer–early autumn’ period during which viral abundances were highest, and occurred concomitantly with a reduction in the abundance of bacteria. For all three lakes, the beginning of the stratification in spring (March to May) stood out as a characteristic period. The PCA for the whole dataset, or for the epilimnion alone (not shown) generally made it possible to discriminate between samples from May and those of March and April. In May, high productivity was observed in Lake Annecy (marked peak of pigmented eukaryotes was observed in the epilimnion), whereas in the mesotrophic lakes, this period corresponded to a short phase known as the “clear water” phase. During this latter phase, P-PO₄ concentrations fell, and the transparency rose again, temporarily.

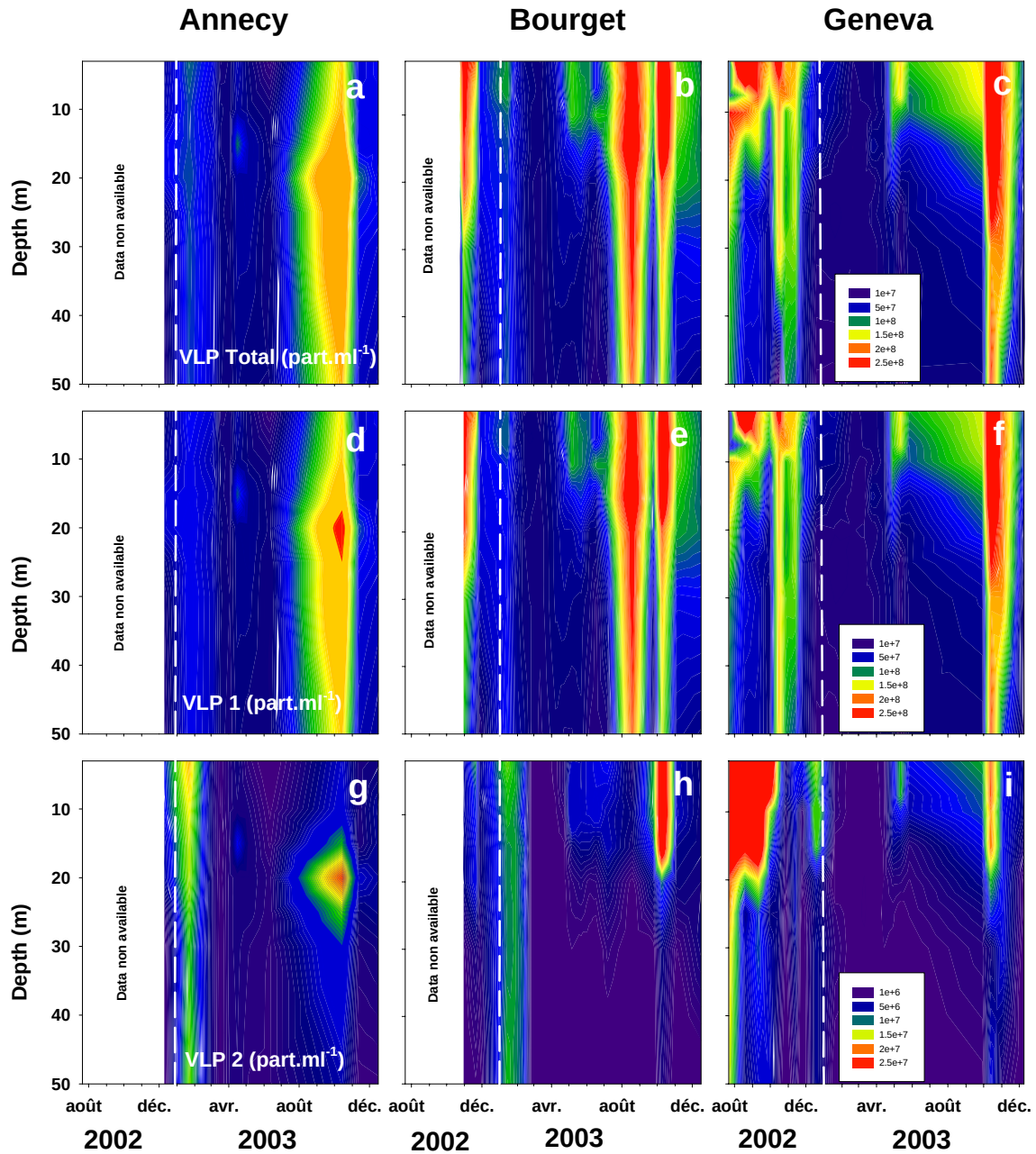


Fig. 6 Development of total virus like particles (a, b, c), and of the VLP 1 (d, e, f) and VLP 2 (g, h, i) between August 2002 and December 2003 in the surface waters (0-50 meters) of Lakes Annecy, Bourget, and Geneva.

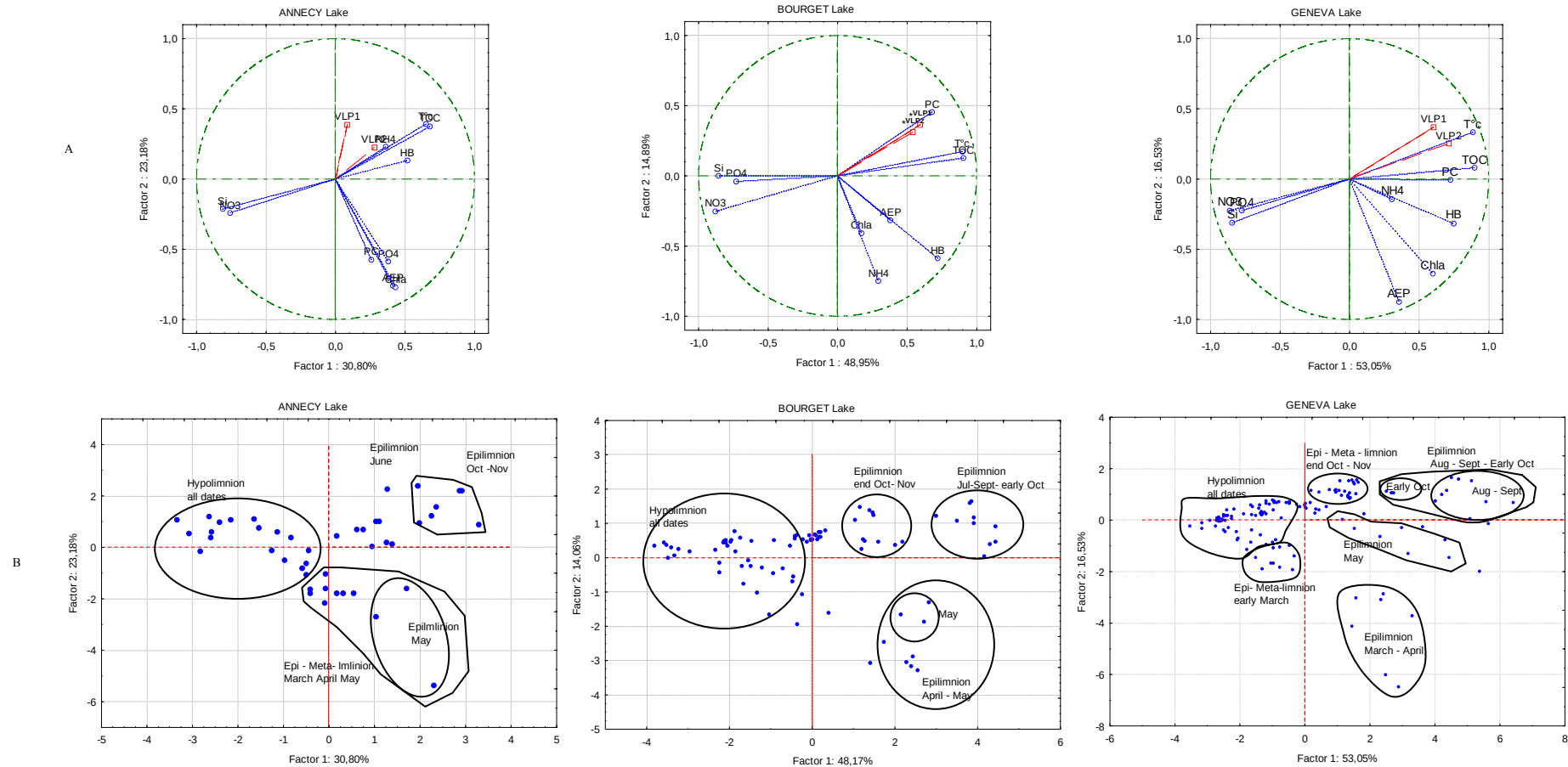


Fig. 7 Plot of principal components 1 vs2: principal component variable loading plots are shown for each lake (a) showing the projection of the variables onto the factor plane 1x2. The second series of loading plots (b) represents the scores of the samples (samples characterized by the depth and date of sampling) on the plane defined by components 1 and 2. Spatial and temporal clusters are represented.

Discussion

The succession observed in the abundance of the different communities revealed the same general pattern in all three lakes, but with some specific features depending on the trophic status of the lake. Even though the three systems studied are not characterized by a large difference in regards to their trophic status, the analysis of our dataset using PCA clearly highlighted the impact of reduced nutrient concentrations on the functioning of microbial communities in the more oligotrophic system. In particular, the importance of P-PO₄ as a productivity-limiting factor emerged clearly. In agreement with previous studies, which reported the increase of viruses and heterotrophic bacteria densities in productive and nutrient-rich environments (Wommack & Colwell, 2000; Gasol & Duarte, 2000) we observed higher abundances of heterotrophic bacteria and viruses in the two mesotrophic lakes. These lakes displayed similar dynamics for chlorophyll *a*, small pigmented eukaryotes, picocyanobacteria, heterotrophic bacteria, and VLPs, whereas Lake Annecy shows some specificity, especially with regard to the dynamics of the viral and bacterial communities. In the oligotrophic lake, heterotrophic bacteria displayed a single major development peak, mainly during summer, whereas several periods of high bacterial densities were observed in the other two lakes, in spring, summer, and autumn. Our results show that the dynamic patterns of heterotrophic bacteria paralleled those of the pico- and nanophytoplankton populations, suggesting that picocyanobacteria and EAP could provide significant resources (via DOC exudation) for heterotrophic bacterial growth. PCA was able to distinguish these 'key' periods in the dynamics of microbial communities. The partial correlations carried out for these definite periods showed that, depending on the period and on the trophic status of the lake, total organic carbon was linked to the levels of picocyanobacteria, small eukaryotes, or total chlorophyll *a* concentrations (data not shown), suggesting changes in the origin and quality of the resources available for heterotrophic bacteria.

In the oligotrophic Lake Annecy, the total organic carbon concentration was always correlated to picocyanobacterial concentrations. In this lake, picocyanobacteria were more abundant, and dominated the picophytoplankton for a rather long period, from spring to the end of autumn. When nutrients are a limiting factor, autotrophic picoplankton (APP) cells could compete against bigger phototrophic organisms, so it is not surprising that APPs were particularly abundant in this lake (Raven, 1986). Moreover, FCM analysis suggested that there is a difference in picocyanobacteria composition between oligotrophic and mesotrophic lakes, and at least 2 groups of picocyanobacteria could indeed be isolated in Lake Annecy, whereas Lakes Bourget and Geneva, each contained only one discriminable group. We observed that picocyanobacteria peaked earlier in Lake Annecy, as soon as nutrients increased before the stratification period (spring), whereas this did not occur until the stratification period in both Lakes Bourget and Geneva. The relative importance of factors regulating picocyanobacteria dynamics (temperature, vertical mixing, nutrients ...) seemed to vary according to the trophic status of the lake. We did not observe the clear bimodal pattern with a first peak in spring and a second one in autumn, as has been reported for many other aquatic systems by Weisse & Kenter, 1991; Padisak *et al.*, 1997; and Callieri & Stockner, 2002. Similarly to the observations of Crosbie, Teubner & Weisse (2003) in Lake Mondsee (Austria), we assume that typical physical factors, such as mixing, and especially the weak stratification in March/April, probably explain the absence of the spring peak in Lakes Bourget and Geneva. In Lake Annecy, the picocyanobacteria spring peak may have been promoted by reduced vertical mixing intensity, and oligotrophic conditions. This was recently confirmed in a comparative study dealing with the dynamics and diversity of pico, nano- and microphytoplankton in Lakes Annecy, Bourget, and Geneva in 2005 (Cellamare, Rolland & Jacquet, unpublished).

As regards virioplankton, lower abundances were recorded in Lake Annecy but the

magnitude of seasonal variations in this lake was far greater than the inter-lake variations. A quite similar seasonal pattern was observed for the virioplankton in all three lakes, with the greatest viral abundance occurring in fall and at depth. This kind of autumnal viral peak, following an increase in bacterial abundance, has been reported in previous studies in both marine and freshwater systems (Wommack & Colwell, 2000). Such a peak has been indeed recorded in seawater (Bergh *et al.*, 1989), Chesapeake Bay (Wommack *et al.*, 1992), Tampa Bay (Cochlan *et al.*, 1993), the Northern Adriatic Sea (Weinbauer & Peduzzi, 1995), the backwater system of the Danube River (Mathias, Kirchner & Velimirov, 1995), the alkaline and hypersaline Mono lake (Brum *et al.*, 2005) and in Norwegian coastal waters (Bratbak *et al.*, 1996). The situation is clearly the same in the three pre-alpine lakes studied here. Thus, a viral termination of bacterial high abundance could occur in autumn. The highest abundances of virioplankton were generally observed in the top 20 m of the water column, except during autumnal periods of high viral densities, when the virioplankton concentration was fairly uniform throughout the water column (0-50 m). The particularly high magnitude of these autumnal peaks could be linked to the larger initial virioplankton and bacterioplankton populations (summer) at the beginning of the autumn bloom, as suggested by Wommack & Colwell, 2000. Moreover, the important concentrations of viruses found in early autumn could also be attributed to low decay rates in surface waters at that time, typically due to a lower negative effect of UV. This could also be associated with water column mixing and bacterial stimulation by both organic and inorganic nutrients. The viral infectivity was probably high at this time as we have recently shown that virus-induced bacterial mortality is important and significantly higher at the end of the fall than in the summer in Lake Bourget (Sime-Ngando *et al.*, submitted). At least, higher VBR values recorded in deeper waters could suggest a higher impact of viruses on bacteria compared to surface waters, as demonstrated elsewhere (Weinbauer & Hofle, 1998; Colombet *et al.*, 2006). According to Hara *et al.* (1996) and based on the diffusion transport theory (Murray & Jackson, 1992), an increased propensity for virus-host contact (high VBR) would select for bacterioplankton strains with smaller cell sizes. Yet, this has not been verified for Lakes Geneva, Bourget and Annecy.

Based on side scatter and green DNA dye complex fluorescence, FCM data allowed us to discriminate clearly 2 groups of viruses. The abundance of VLP1 was found to be 10 to 100 fold higher than the abundance of VLP2. Published works by different authors (Marie *et al.*, 1999; Wommack & Colwell, 2000; Larsen *et al.*, 2001; Culley & Welschmeyer, 2002) indicate that most of the VLP1 group is likely to consist of bacteriophages. Unlike Larsen *et al.*, 2004, we were not able to differentiate and observe a full seasonal cycle of other viral groups, such as VLP3 and VLP4. In a recent study, we confirmed the presence of at least 4 main viral groups, but once more, we could not observe them at all times. Note however it is likely that these two last groups are related to phytoplankton (Duhamel *et al.*, 2006). Our data for the dynamics of VLP1 plus those for heterotrophic bacteria allowed us to suggest that VLP1 do indeed consist mainly of bacteriophages, and that they had a considerable lytic impact during end of summer-early autumn in all three lakes investigated. In the same way, VLP2 were probably linked to either picocyanobacteria or small eukaryotes, or both.

The homogeneous functional periods that we have identified, corresponding to changes in the structure of microbial communities, may not strictly match the usual seasonal divisions (*i.e.* spring, summer, autumn and winter). A previous study conducted in the epilimnion of Lake Bourget from March to July 2002 had already suggested that the dynamics of bacteria and protozoans involve 3 periods: March/April, May, and June/July characterized by variations in abundance, structure, and the relative degree of regulatory pressure (Comte *et al.*, 2006). Typically, the early spring was characterised by mixotrophic and heterotrophic flagellates which constituted the main bacterivores, and were regulated by the availability of their resources. Then, once the “clear-water phase” was established, the

predation pressure of metazooplankton represented a strong top-down force on all microbial compartments. At last, the early summer was characterized by the highest impact of protozoan grazing, and by a rapid shift in the carbon pathway transfer, with a rapid change in the contributions of the main predators, *i.e.* mixotrophic, heterotrophic flagellates and ciliates to bacterial mortality. The data presented here, obtained over a longer period of time, corroborate these earlier observations, and show that a similar 'seasonal' division was repeated in 2003. Moreover, we noted that a very similar 'seasonal' division is also observed in the dynamics of microbial communities in Lake Geneva.

We recently demonstrated in experimental studies that in Lakes Bourget and Geneva, both viral lysis and flagellate grazing have a considerable impact on bacterial mortality, and that this impact varies seasonally (Duhamel *et al.*, 2006; Jacquet *et al.*, 2005; Sime-Ngando *et al.*, submitted). In Lake Geneva, both nanoflagellates and viruses could be responsible for 31 and 42% of the total daily mortality of heterotrophic bacteria in March-April and May 2004 respectively; the impact of viruses being about 10% in May (Duhamel *et al.*, 2006). The impact of viruses seems to be higher in Lake Bourget, viral lysis being responsible for up to 50% of bacterial mortality on some occasions (Jacquet *et al.*, 2005; Sime-Ngando *et al.*, submitted).

The data reported here suggest that most VLPs were bacteriophages. Using bivariate analysis, we found a power slope of 0.61 and 0.57 between heterotrophic bacteria and VLP or VLP1 respectively (considering the whole dataset). Generally the highest slope values (>0.8) were reported in marine and freshwater systems (Gasol & Duarte, 2000). Whereas the relationships between LogHB and LogChla displayed moderate seasonal variations, in contrast, relationships between LogVLP and LogHB displayed clear seasonal patterns (equations 6 to 9). The highest slope value was found in winter (0.84), and the lowest during Autumn (0.49) suggesting that, for a given bacterial increase, the effectiveness in raising viral abundances was greater in winter than during the autumnal period, as already discussed above. Significant seasonal variations were also noted for the VBR. Summers, and especially early autumns, were clearly characterized by high VBR. Our VBR values were among the highest reported in the literature. It is noteworthy here that our study is one of the rare where VBR values were obtained and provided with FCM, while other studies mainly used epifluorescence microscopy (EFM). As FCM allows discriminating unambiguously bacteria from viruses, it is not impossible that VBR reported using EFM underestimated this parameter (Marie *et al.*, 1999). The magnitudes of seasonal variations in VBR were considerably higher than differences observed between the three lakes, suggesting seasonality in virioplankton production. Seasons in which a high VBR occurred could be expected to display greater virioplankton production and, more bacterioplankton lysis. It is clear that VBR is only a proxy used to investigate possible relationships between viruses and their hosts, so that it is clearly not sufficient to allow us to infer the importance of the role played by the viruses.

We did not find any significant correlation between viral abundance (all VLPs) or VLP1 and chlorophyll *a* concentrations, suggesting firstly that phytoplankton viruses do not contribute significantly to the total virus pool, and secondly that the positive effect of an increase in chlorophyll *a* on heterotrophic bacteria is not directly beneficial to virus production. In contrast, VLP2, which we had thought was more specific to phytoplanktonic or cyanobacterial viruses, was observed to be significantly linked to chlorophyll *a* and picocyanobacterial concentrations. However, chlorophyll *a* which represents a crude approximation of the algal biomass is probably not the best parameter to use in attempting to identify virus/parasite relationships (Verity, 1992; Gasol & Duarte, 2000). Moreover the specificity of viruses to their hosts implies that phytoplanktonic groups must also be taken into consideration. The first discrimination we carried out using flow cytometry analysis to distinguish between two groups of PC in the oligotrophic lake confirmed this point. Indeed,

significant correlations appeared between VLP2 and PC in Lakes Bourget and Geneva ($r=0.48$ and $r=0.68$, respectively, $p<0.05$) whereas this kind of relationship was found for Lake Annecy only if a distinction was done between PC groups ($r=0.51$, $p<0.05$ between VLP2 and PC1). We also know from our own findings, and from the literature, that up to 4 distinct groups of viruses can be identified in natural samples using FCM (Chen *et al.*, 2001; Castberg *et al.*, 2001; Jacquet *et al.*, 2002; Goddar *et al.*, 2005; Duhamel *et al.*, 2006). So far, the VLP4 group is the only one of the four to form a clear homogenized population, easily distinguishable from other particles. In all but one study (Goddard *et al.*, 2005), the VLP4 group has been assigned as being specific to phytoplankton. In this study, we only observed VLP4 during the spring period, and it was indeed possible to correlate its dynamics to that of the phytoplanktonic community (and more likely to diatoms or chlorophytes according to Cellamare, Rolland & Jacquet, unpublished), but not to the cyanobacteria or heterotrophic bacteria (not shown). The determination of each phytoplankton group and its dynamics in Lakes Annecy, Bourget, and Geneva on the basis of the FCM signature and classical microscopy should be very helpful in the future to enable us to focus on virus-algal interactions.

Acknowledgments

Monika Ghosh is acknowledged for improving the English. We are grateful to Marie Perga for their help with statistical analyses. SP was funded by a grant from the French Research and Technology Ministry. This study is an innovative part of the French ACI Microbiology Project grant awarded to Christian Amblard. This is also an EWAPE-1 (1st European Workshop on Aquatic Phage Ecology held in Thonon-les-Bains and convened by SJ) contribution.

References

- Anesio A.M., Hollas C., Granéli W. & Laybourn-Parry J. (2004) Influence of Humic Substances on Bacterial and Viral Dynamics in Freshwaters. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4848-4854.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer Reil M.A. & Thingstad T.F. (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257-263.
- Bell T. & Kalff J. (2001) The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography*, **46**, 1243-1248.
- Bergh O., Borsheim K.Y., Bratbak G. & Haldal M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-468.
- Billen G. & Fontigny A. (1987) Dynamics of a Phaeocystis-dominated spring bloom in Belgian coastal waters. II. Bacterioplankton dynamics. *Marine Ecology Progress Series*, **37**, 249-257.
- Bouvy M., Arfi R., Cecchi P., Corbin D., Pagano D., Saint Jean L. & Thomas S. (1998) Trophic coupling between bacterial and phytoplanktonic compartments in shallow tropical reservoirs (Ivory Coast, West Africa). *Aquatic Microbial Ecology*, **15**, 25-37.
- Bratbak G., Haslund O.H., Head I.M., Naess A. & Roeggen T. (1992) Giant marine viruses. *Marine Ecology Progress Series*, **85**, 201-202.
- Bratbak G., Haldal M., Norland S. & Thingstad T.F. (1990) Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1400-1405.

- Bratbak G., Haldal M., Thingstad T.F. & Tuomi P.I. (1996) Dynamics of virus abundance in coastal sea water. *FEMS Microbiology Ecology*, **19**, 263-269.
- Brum J.R., Stewart G.F., Jiang S.C. & Jellison R. (2005) Spatial and temporal variability of prokaryotes, viruses, and viral infections of prokaryotes in an alkaline, hypersaline lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **41**, 247-260.
- Brussaard C.P.D. (2004) Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1506-1513.
- Caron D.A., Pick F. & Lean D.R.S. (1985) Chroococcoid cyanobacteria in lake Ontario: vertical and seasonal distributions during 1982. *Journal of Phycology*, **21**, 171-175.
- Castberg T., Larsen A., Sandaa R.A., Brussaard C.P.D., Egge J.K., Haldal M., Thyrhaug R., van Hannen E.J. & Bratbak G. (2001) Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Marine Ecology Progress Series*, **221**, 39-46.
- Chen F., Lu J.R., Binder B.J., Liu Y.C. & Hodson R.E. (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 539-545.
- Cochlan W.P., Wilkner J., Stewart G.F., Smith D.C. & Azam F. (1993) Spatial distribution of viruses, bacteria, chlorophyll *a* in neritic, oceanic and estuarine environments. *Marine Ecology Progress Series*, **92**, 77-87.
- Cole J.J., Findlay S. & Pace M.L. (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series*, **43**, 1-10.
- Colombet J., Sime-Ngando T., Cauchie H.M., Fonty G., Hoffmann L. & Demeure G. (2006) Depth-related gradients of viral activity in lake Pavin. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4440-4445.
- Comte J., Jacquet S., Viboud S., Fontvieille D., Paolini G. & Domaizon I. (2006) Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, February to July 2002). *Microbial Ecology*, **52**, 72-89.
- Courties C., Vaquer A., Trousselier M., Chrétiennot-Dinet M.J., Neveux J., Machado C. & Claustre H. (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature*, **370**, 255.
- Crosbie N.D., Teubner K. & Weisse T. (2003) Flow cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **33**, 53-66.
- Culley A.I. & Welschmeyer N.A. (2002) The abundance, distribution and correlation of viruses, phytoplankton and prokaryotes along a Pacific Ocean transect. *Limnology and Oceanography*, **47**, 1508-1513.
- Currie D.J. (1990) Large scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton and phosphorous. *Limnology and Oceanography*, **35**, 1437-1455.
- Danovaro R., Dell'Anno A., Trucco A., Serresi M. & Vanucci S. (2001) Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1384-1387.
- Del Giorgio P.A. & Peters R.H. (1993) Balance between phytoplankton production and plankton respiration in lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 282-289.
- Del Giorgio P.A. & Scarborough G. (1995) Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: implications for estimates of bacterial growth and production rates. *Journal of Plankton Research*, **17**, 1879-1903.
- Duhamel S., Domaizon I., Personnic S. & Jacquet S. (2006) Assessing the microbial community dynamics and the role of bacteriophages as mortality agents in Lake Geneva. *Journal of Water Science*, **19**, 115-126.

- Duhamel S. & Jacquet S. (2006) Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **64**, 316-332.
- Fuhrman J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541-548.
- Gasol J.M. & Duarte C.M. (2000) Comparative analyses in aquatic microbial ecology: how far do they go? *FEMS Microbiology Ecology*, **31**, 99-106.
- Gasol J.M., Simons A.M. & Kalff J. (1995) Patterns in the top-down versus bottom-up regulation of heterotrophic nanoflagellates in temperate lakes. *Journal of Plankton Research*, **17**, 1879-1903.
- Goddard V., Baker A. C., Davy J.E., Adams D.G., Thackeray S.J., Maberly S.C. & Wilson W.H. (2005) Temporal distribution of viruses, bacteria and phytoplankton throughout the water column in a freshwater hypereutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **39**, 211-223.
- Hagstrom A., Azam F., Anderson A., Wikner J. & Rassoulzadegan F. (1988) Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Marine Ecology Progress Series*, **49**, 171-178.
- Hambly E. & Suttle C.A. (2005) The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 444-450.
- Jacquet S., Domaizon I., Personnic S., Duhamel S., Haldal M., Pradeep Ram A.S. & Sime-Ngando T. (2005) Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshwater Biology*, **50**, 627-645.
- Jacquet S., Havskum H., Thingstad T. F. & Vaulot D. (2002) Effects of inorganic and organic nutrient addition on a coastal microbial community (Isefjord, Denmark). *Marine Ecology Progress Series*, **228**, 3-14.
- Jacquet S., Haldal M., Iglesias-Rodriguez D., Larsen A., Wilson W. & Bratbak G. (2002) Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 111-124.
- Jeppesen E., Erlandsen M. & Sondergaard M. (1997) Can simple empirical equations describe the seasonal dynamics of bacterioplankton in lakes: An eight-year study in shallow hypertrophic and biologically highly dynamic lake Sobygard, Denmark. *Microbial Ecology*, **34**, 11-26.
- Jiang S.C. & Paul J.H. (1995) Viral contribution to dissolved DNA in the marine environment differential centrifugation and kingdom probing. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 317-325.
- Johnson P.W. & Sieburth J.M. (1979) Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography*, **24**, 928-935.
- Kana T.M. & Glibert P.M. (1987) Effect of irradiances up to 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803: I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep-Sea Research*, **34**, 479-495.
- Larsen A., Castberg T., Sandaa R.A., Brussaard C.P.D., Egge J., Haldal M., Paulino A., Thyraug R., van Hannen E.J. & Bratbak G. (2001) Population dynamics and diversity of phytoplankton, bacteria and viruses in a seawater enclosure. *Marine Ecology Progress Series*, **221**, 47-57.
- Larsen A., Flaten G.A.F., Sandaa R.A., Castberg T., Thyraug R., Erga S.R., Jacquet S. & Bratbak G. (2004) Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography*, **49**, 180-190.
- Lefranc M., Thénot A., Lepère C. & Debroas D. (2005) Genetic diversity of small Eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5935-5942.

- Lefèvre E., Bardot C., Noël C., Carrias J. F., Viscogliosi E., Amblard C. & Sime-Ngando T. (2007) Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environmental Microbiology*, **9**, 61-71.
- Lepère C., Boucher D., Jardillier L., Domaizon I. & Debroas D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake Pavin). *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 2971-2981.
- López-García P., Rodríguez-Valera F., Pedrós-Alió C. & Moreira D. (2001) Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, **409**, 603-607.
- Maranger R. & Bird D.F. (1995) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series*, **121**, 217-226.
- Marie D., Brussaard C.P.D., Thyrhaug R., Bratbak G. & Vaulot D. (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 45-52.
- Marie D., Partensky F., Jacquet S. & Vaulot D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 186-193.
- Marie D., Partensky F., Simon N., Guillou L. & Vaulot D. (2000) Flow cytometry analysis of marine picoplankton. *Living Colors: Protocols in Flow Cytometry and Cell sorting*, 421-454. (Link to Book content).
- Mathias C.B., Kirchner A.K.T. & Velimirov B. (1995) Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3734-3740.
- Moon-van der Staay S.Y., de Wachter R. & Vaulot D. (2001) Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, **409**, 607-610.
- Murray A.G. & Jackson G.A. (1992) Viral dynamics: a model of the effects of size, shape, motion and abundance of single-celled planktonic organisms and other particles. *Marine Ecology Progress Series*, **89**, 103-116.
- Noble R.T. & Fuhrman J.A. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 113-118.
- Padisak J., Krienitz L., Koschel R. & Nedoma J. (1997) Deep-layer autotrophic picoplankton maximum in the oligotrophic Lake Stechlin, Germany: origin, activity, development and erosion. *European Journal of Phycology*, **32**, 403-416.
- Partensky F., Blanchot J. & Vaulot D. (1999) Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, numéro spécial*, **19**, 431-449.
- Paul J.H. & Jiang S.C. (2001) Lysogeny and transduction. *Methods in microbiology: Marine microbiology*, J. H. Paul (Ed), Academic Press, **30**, 105-125.
- Raven J.A. (1986) Physiological consequences of extremely small size for autotrophic organisms in the sea. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, **241**, 1-70.
- Rodríguez F., Fernandez E., Head R.N., Harbour D.S., Bratbak G., Heldal M. & Harris R.P. (2000) Temporal variability of viruses, bacteria, phytoplankton and zooplankton in the western English Channel off Plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 575-586.
- Rose J.M., Caron D.A., Sieracki M.E. & Poulton N. (2004) Counting heterotrophic nanoplanktonic protists in cultures and aquatic communities by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **34**, 263-277.
- Schallenberg M. & Burns C.W. (2001) Tests of autotrophic picoplankton as early indicators of nutrient enrichment in an ultra-oligotrophic lake. *Freshwater Biology*, **46**, 27-37.
- Shortreed K.S. & Stockner J.G. (1986) Trophic status of 19 subarctic lakes in the Yukon Territory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **43**, 797-805.

- Sime-Ngando T., Domaizon I., Colombet J., Dorigo U., Perney P., Hustache J. C., Personnic S., Viollier E. & Jacquet S. (submitted) 'Seasonal anomaly' in microbial food web of a freshwater pelagial: evidence from short-term studies in Lake Bourget (France).
- Simon M., Bunte C., Schulz M., Weiss M. & Wünsch C. (1998) Bacterioplankton dynamics in lake constance (Bodensee): substrate utilization, growth control, and long term trends. *Archives Hydrobiologica Special Issues on Advanced Limnology*, **53**, 195-221.
- Stokner J.G. & Antia N.J. (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **43**, 2472-2503.
- Tzaras A. & Pick F.R. (1994) The relationships between bacterial and heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in oligotrophic and mesotrophic temperate lakes. *Marine Microbial Food Webs*, **8**, 347-355.
- Vaulot D. (1989) CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise*, **2**:8.
- Verity P.G. (1992) Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnology and Oceanography*, **37**, 1434-1446.
- Vrede K., Stensdotter U. & Lindström E.S. (2003) Viral and bacterioplankton dynamics in two lakes with different humic contents. *Microbial Ecology*, **46**, 406-415.
- Waterbury J.B., Watson S.W., Guillard R.R.L. & Brand L.E. (1979) Widespread occurrence of a unicellular marine planktonic cyanobacterium. *Nature*, **277**, 293-294.
- Waterbury J.B., Watson S.W., Valois F.W. & Franks D.G. (1986) Biological and Ecological characterisation of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, **214**, 71-120.
- Weinbauer M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 127-181.
- Weinbauer M.G. & Peduzzi P. (1995) Effect of virus-rich high molecular weight concentrates of seawater on the dynamics of dissolved amino acids and carbohydrates. *Marine Ecology Progress Series*, **127**, 245-253.
- Weinbauer M.G. & Rassoulzadegan F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity. *Environmental Microbiology*, **6**, 1-11.
- Weinbauer M.G. & Hofle M.G. (1998) Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 431-438.
- Weisse T. & Kenter U. (1991) Ecological characteristics of autotrophic picoplankton in a prealpine lake. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 493-504.
- Wilhelm S.W. & Suttle C.A. (1999) Viruses and Nutrient Cycles in the Sea - Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, **49**, 781-788.
- Wommack K., Hill R. T., Kessel M., Russek-Cohen E. & Colwell R.R. (1992) Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2965-2970.
- Wommack K.E. & Colwell R.R. (2000) Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 69-114.
- Xenopoulos M.A. & Bird D.F. (1997) Virus à la sauce Yo-Pro: Microwave-enhanced staining for counting viruses by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography*, **42**, 1648-1650.
- Zinabu G.M. & Taylor W.D. (1997) Bacteria – chlorophyll relationships in Ethiopian lakes of varying salinity: are soda lakes different? *Journal of Plankton Research*, **19**, 647-654.

IV.2 Dynamique des communautés microbiennes des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre 2004 et 2006

IV.2.a Suivis pluriannuels des données physico-chimiques

Le suivi pluriannuel des valeurs de température a permis de délimiter la zone de stratification thermique des lacs, débutant en fin de période printanière (mai) et se terminant en fin de période estivale (octobre) (Tableau IV-1). Durant la période stratifiée, la colonne d'eau peut être schématiquement découpée en 3 zones : l'épilimnion situé entre la surface et 15 mètres de profondeur, la thermocline localisée dans une zone variable selon les lacs et la période entre 15 et 30 mètres et enfin l'hypolimnion situé entre le fond du lac et la thermocline. Ces profondeurs moyennes de division de la colonne d'eau en 3 couches, ont néanmoins varié de quelques mètres d'une année à l'autre et d'un lac à l'autre (Fig. IV-1)

Tableau IV-1: Température moyenne (calculée sur les trois années 2004, 2005, 2006) dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy pour différentes profondeurs intégrées et à différentes périodes de l'année.

Température (°C)		Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
Novembre - Avril 0-15 mètres	Moyenne	7,26	7,25	6,86
	Ecartype (E-T)	1,96	2,67	2,43
	Effectifs (N)	100	128	57
Novembre - Avril 15-50 mètres	Moyenne	6,51	6,13	5,45
	Ecartype (E-T)	1,23	1,39	1,03
	Effectifs (N)	100	95	75
Mai - Octobre 0-15 mètres	Moyenne	15,17	16,69	14,38
	Ecartype (E-T)	3,81	4,63	5,03
	Effectifs (N)	136	246	73
Mai - Octobre 15-50 mètres	Moyenne	8,55	7,05	6,01
	Ecartype (E-T)	2,29	1,64	1,01
	Effectifs (N)	136	184	92

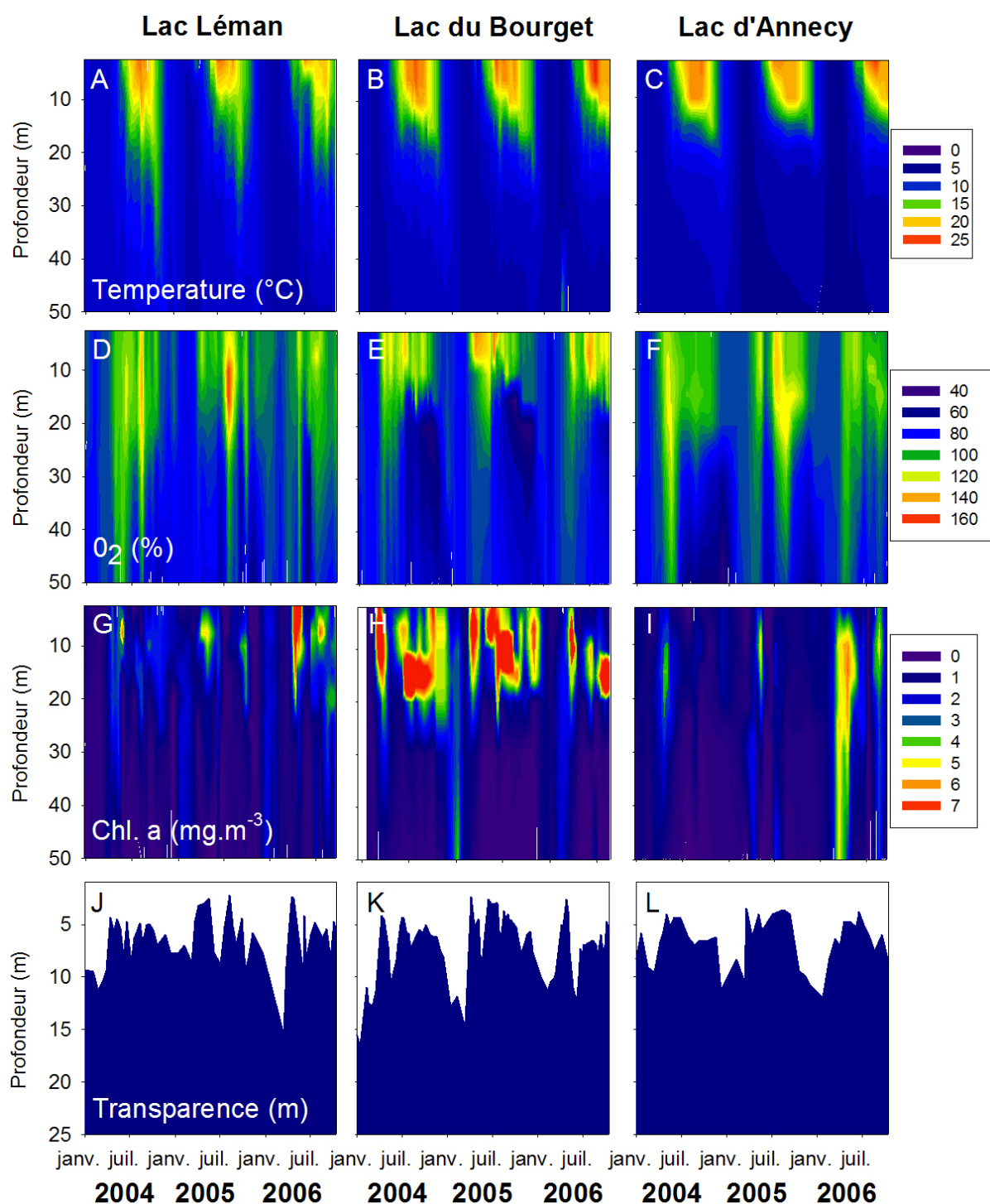


Figure IV-1 : Séries temporelles obtenues pour la température (A, B, C), la saturation en oxygène (D, E, F), la chlorophylle a (G, H, I) et la transparence (J, K, L) entre janvier 2004 et octobre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

La saturation en oxygène a atteint des valeurs très élevées entre 0 et 50 mètres du mois de mars au mois de mai quelque soit le lac considéré. Du mois de mai au mois de novembre, la forte saturation a été concentrée dans la zone des 20 premiers mètres (Fig. IV-1). Cette répartition était en adéquation avec la répartition des températures de la colonne d'eau et des organismes phytoplanctoniques (Fig. IV-1). De mai à octobre, on a observé une saturation moyenne supérieure à 100% dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre la surface et 20 mètres de profondeur (Tableau IV-2). Cette saturation moyenne a diminué très nettement de novembre à février pour atteindre des valeurs moyennes de l'ordre de 80% (Tableau IV-2). L'augmentation de la saturation en oxygène a été très nette à partir du mois de mars-avril sur toute la colonne d'eau (Tableau IV-2), atteignant des valeurs moyennes entre 91 et 95% pour les trois lacs.

Tableau IV-2 : Saturation moyenne en oxygène (calculée sur les trois années 2004, 2005, 2006) dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy pour différentes profondeurs intégrées et à différentes périodes de l'année.

Oxygène (%)		Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
Novembre - Février 0-50 mètres	Moyenne	82,45	77,54	82,36
	Ecartype (E-T)	6,88	9,61	10,31
	Effectifs (N)	96	112	70
Mars - Avril 0-50 mètres	Moyenne	91,39	93,49	95,68
	Ecartype (E-T)	10,61	15,00	9,49
	Effectifs (N)	88	70	63
Mai - Octobre 0-20 mètres	Moyenne	104,44	104,54	107,67
	Ecartype (E-T)	12,64	18,30	10,04
	Effectifs (N)	144	240	69
Mai - Octobre 20-50 mètres	Moyenne	89,25	71,46	89,43
	Ecartype (E-T)	15,69	11,86	15,65
	Effectifs (N)	144	180	92

La concentration moyenne en chlorophylle *a* a été très supérieure dans le lac du Bourget par rapport à la concentration mesurée dans le Léman et le lac d'Annecy. La concentration en chlorophylle *a* été, en moyenne sur les 3 années, de 2,86 mg.m⁻³ (E-T 3,39 ; N=335) dans le lac du Bourget, soit quasiment deux fois la concentration annuelle enregistrée au Léman et au lac d'Annecy qui ont été respectivement de 1,53 mg.m⁻³ (E-T 1,51 ; N=392) et de 1,62 mg.m⁻³ (E-T 1,47 ; N=266), (Tableau IV-3). Dans le lac du Bourget, la chlorophylle *a* a présenté des pics de concentration dans l'épilimnion au printemps et en été (Fig. IV-1) alors que dans le lac d'Annecy ce pic est apparu entre 0 et 50 m au début du printemps. Dans le Léman, on a assisté également à des pics de concentration printaniers

durant les 3 années de suivi et un pic unique estival en 2006, dans l'épilimnion (Fig. IV-1). Les études conduites sur le lac du Bourget dans le cadre de « l'étude lourde du lac du Bourget 2004-2005 » (CISALB, 2006) ont permis d'identifier les groupes d'algues responsables des fortes biomasses phytoplanctoniques. La biomasse annuelle moyenne du lac du Bourget en 2004-2005 a été très forte, en comparaison de celles observées sur les autres lacs péri-alpins, confirmant les observations effectuées par la mesure de la chlorophylle *a* dans cette étude. La forte biomasse annuelle moyenne du lac du Bourget a été essentiellement due à la présence de *Planktothrix rubescens* car cette espèce a été présente durant tout l'hiver 2004-2005. En revanche le reste de l'année, les valeurs obtenues dans le lac du Bourget en 2004-2005 se sont situées dans le même ordre de grandeur que celles observés dans les lacs Léman et d'Annecy au printemps.

Les valeurs de transparence des lacs Léman et du Bourget ont présenté une amplitude de variations plus importante que celle du lac d'Annecy (Fig. IV-1), cependant les valeurs moyennes de transparence durant les trois années étaient sensiblement équivalentes : 6,49 m (E-T 2,53 ; N=58) pour le Léman, 7,20 m (E-T 2,96 ; N=88) pour le lac du Bourget et 6,58 m (E-T 2,38 ; N=42) pour le lac d'Annecy.

Tableau IV-3 : Statistiques descriptives des valeurs de concentration en chlorophylle *a* et de transparence calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006, dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Chlorophylle <i>a</i> et transparence		Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
Chlorophylle <i>a</i> (mg.m ⁻³)	Moyenne	1,53	2,86	1,62
	Ecartype (E-T)	1,51	3,39	1,47
	Max	13,47	23,18	6,29
	Min	0,00	0,00	0,00
	Effectifs (N)	392	335	266
Transparence (m)	Moyenne	6,49	7,20	6,58
	Ecartype (E-T)	2,53	2,96	2,38
	Max	2,20	2,40	3,50
	Min	15,50	16,60	12,00
	Effectifs (N)	58	88	42

La répartition au cours du temps des éléments nutritifs a permis de séparer très nettement le Léman et le lac du Bourget du lac d'Annecy (Fig. IV-2). Alors que les concentrations moyennes entre 2004 et 2006 en azote ammoniacal (N-NH₄) dans les trois lacs ont été sensiblement équivalentes, les concentrations moyennes en azote nitrique (N-NO₃) et en orthophosphate (P-PO₄) ont été deux et dix fois supérieures dans les lacs Léman et du Bourget par rapport au lac d'Annecy (Tableau VI-4). En revanche, cette relation s'est

inversée pour la silice réactive, dont la concentration moyenne dans le lac d'Annecy a été deux fois supérieure à celle des lacs Léman et du Bourget. L'évolution temporelle des concentrations en N-NO_3 , P-PO_4 et SiO_2 (Fig. IV-2) ont permis d'observer indirectement mais très nettement les périodes de forte activité biologique (l'utilisation des éléments nutritifs) et de la stratification thermique (l'absence de mélange des eaux). En effet les concentrations ont chuté fortement durant la fin de la période printanière et pendant toute la période estivale et automnale. A ces périodes, les éléments nutritifs ont été utilisés par les organismes phytoplanctoniques (et peut être aussi les bactéries). Suite au brassage hivernal de la colonne d'eau, ces concentrations sont redevenues importantes dans les eaux de surface durant le reste de l'année.

Tableau IV-4 : Statistiques descriptives des concentrations d'azote ammoniacal (N-NH_4), d'azote nitrique (N-NO_3), d'orthophosphates (P-PO_4) exprimées en $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de silice réactive (SiO_2) exprimées en mg.L^{-1} , calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Sels Nutritifs		Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
N-NH_4 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Moyenne	6,79	5,69	5,59
	Ecartype (E-T)	10,99	7,89	6,63
	Max	82,00	42,00	46,00
	Min	0,00	0,00	0,00
	Effectifs (N)	336	312	205
N-NO_3 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Moyenne	503,78	502,31	236,59
	Ecartype (E-T)	151,57	241,13	100,05
	Max	750,00	890,00	630,00
	Min	40,00	0,00	0,00
	Effectifs (N)	328	312	205
P-PO_4 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Moyenne	10,923	9,497	1,741
	Ecartype (E-T)	13,322	9,991	0,993
	Max	200,000	37,000	5,000
	Min	0,000	0,000	0,000
	Effectifs (N)	336	312	205
SiO_2 (mg.L^{-1})	Moyenne	1,146	1,770	2,642
	Ecartype (E-T)	0,651	0,998	1,100
	Max	3,320	4,400	6,030
	Min	0,000	0,000	0,000
	Effectifs (N)	336	310	205

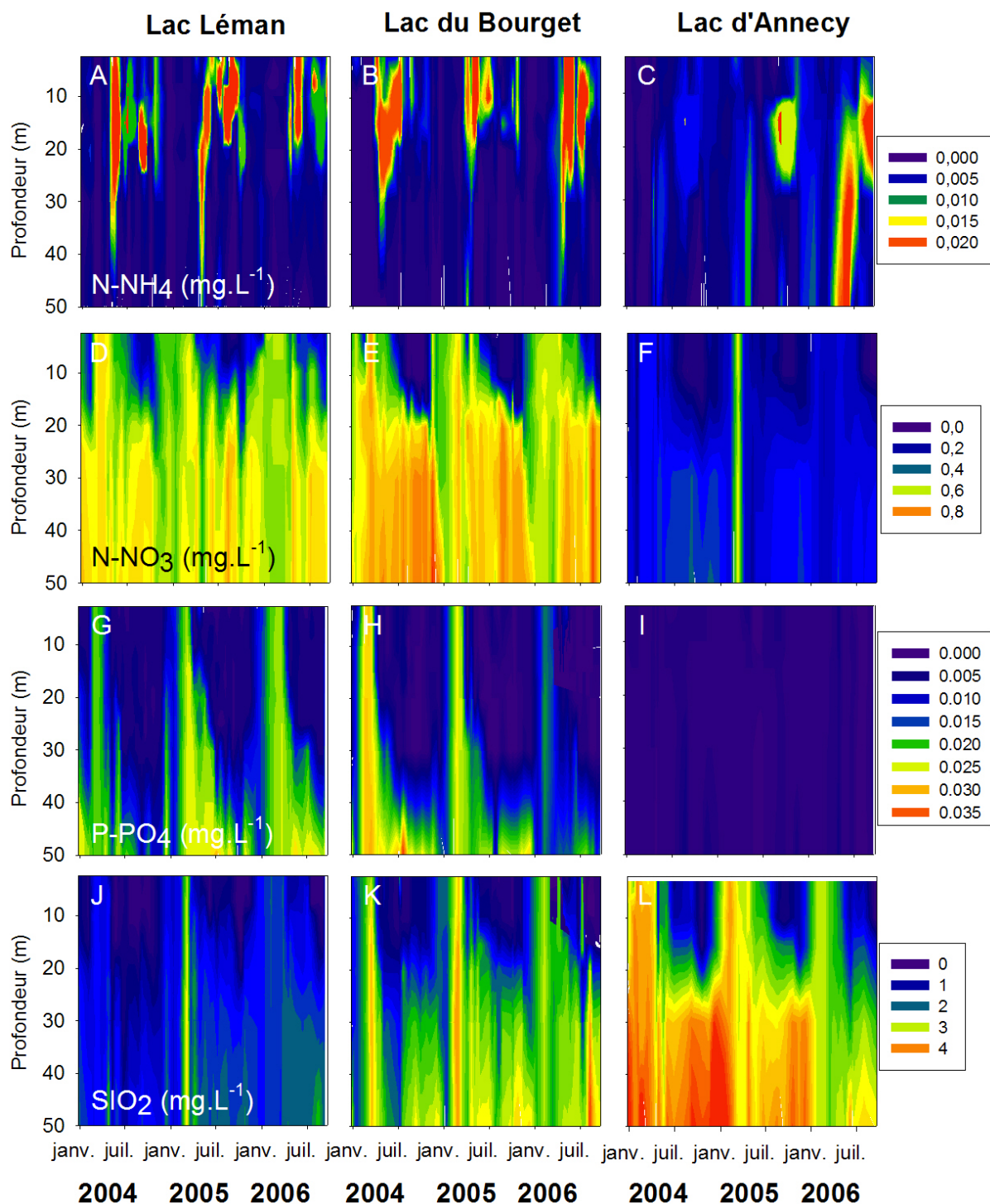


Figure IV-2 : Séries temporelles obtenues pour les données d'azote ammoniacal (A, B, C), d'azote nitrique (D, E, F), d'orthophosphates (G, H, I) et de silice réactive (J, K, L) entre janvier 2004 et octobre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

IV.2.b Description de la variabilité interannuelle et saisonnière de la dynamique des communautés microbiennes

La dynamique pluriannuelle des communautés microbiennes (picocyanobactéries, bactéries hétérotrophes, etc) analysées en cytométrie en flux ont permis de discriminer les systèmes mésotrophes (Léman et lac du Bourget) du lac d'Annecy, oligotrophe. En effet, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative (test de Man Whitney, $p=0,08$ et $p=0,92$) entre les valeurs de concentration moyenne (calculées de 2004 à 2006 entre 0 et 50 mètres – Tableau IV-5) des bactéries hétérotrophes et des picocyanobactéries pour les lacs Léman et du Bourget alors que ces valeurs de concentration ont été significativement inférieures dans le lac d'Annecy (test de Man Whitney, $p<0,05$). Pour les virus, la concentration moyenne a également été significativement différente entre les trois lacs (test de Man Whitney, $p<0,01$) avec les concentrations les plus basses trouvées dans le lac Léman (et comparable au lac d'Annecy) et les plus élevées dans le lac du Bourget. Pour les protistes hétérotrophes, il n'y avait pas de différence significative entre les valeurs moyennes enregistrées au Léman et au lac du Bourget (test de Man Whitney, $p=0,26$ pour les flagellés et $p=0,94$ pour les ciliés). Malheureusement, aucune donnée n'était disponible pour le lac d'Annecy pour ces compartiments biologiques. Enfin, la concentration moyenne des petits eucaryotes autotrophes a été, quant à elle, significativement supérieure dans le Léman comparativement aux 2 autres lacs (test de Man Whitney, $p<0,01$).

Tableau IV-5 : Statistiques descriptives des bactéries hétérotrophes, virus, picocyanobactéries, petits eucaryotes autotrophes calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Communautés microbiennes		Lac Léman	Lac du Bourget	Lac d'Annecy
Bactéries hétérotrophes (cell.mL ⁻¹)	Moyenne	2,57E+06	2,76E+06	2,11E+06
	Ecartype (E-T)	1,79E+06	1,87E+06	8,66E+05
	Max	1,07E+07	1,08E+07	5,24E+06
	Min	4,32E+05	3,07E+05	3,05E+05
	Effectifs (N)	398	316	272
Virus (part.mL ⁻¹)	Moyenne	5,23E+07	6,43E+07	5,34E+07
	Ecartype (E-T)	4,14E+07	3,95E+07	2,91E+07
	Max	5,15E+08	3,91E+08	2,14E+08
	Min	5,19E+06	1,05E+07	5,10E+06
	Effectifs (N)	382	324	273
Picocyanobactéries (cell.mL ⁻¹)	Moyenne	2,91E+04	2,77E+04	2,30E+04
	Ecartype (E-T)	9,34E+04	6,64E+04	3,67E+04
	Max	1,25E+06	5,19E+05	3,37E+05

	Min	1,91E+01	9,19E+00	0,00E+00
	Effectifs (N)	403	332	273
Petits eucaryotes autotrophes (cell.mL ⁻¹)	Moyenne	3,69E+03	2,91E+03	1,62E+03
	Ecartype (E-T)	6,41E+03	5,51E+03	1,89E+03
	Max	5,25E+04	4,59E+04	1,09E+04
	Min	2,52E+01	0,00E+00	0,00E+00
	Effectifs (N)	404	330	272
Flagellés Hétérotrophes (cell.mL ⁻¹)	Moyenne	1,54E+03	2,23E+03	
	Ecartype (E-T)	2,05E+03	3,82E+03	
	Max	1,19E+04	2,89E+04	
	Min	0,00E+00	3,58E+01	
	Effectifs (N)	155	208	
Ciliés (cell.mL ⁻¹)	Moyenne	1,58E+01	1,70E+01	
	Ecartype (E-T)	1,76E+01	2,14E+01	
	Max	1,26E+02	2,10E+02	
	Min	8,93E-01	0,00E+00	
	Effectifs (N)	135	188	

Les bactéries hétérotrophes ont présenté une dynamique inter-annuelle très similaire durant les trois années : 2004, 2005 et 2006 pour chacun des 3 lacs. Essentiellement, trois pics ou périodes de fortes abondances de cette communauté ont été observés chaque année (printemps, été, automne) dans l'épilimnion du Léman et du lac du Bourget. Dans le lac d'Annecy, en revanche, la dynamique des bactéries hétérotrophes était plutôt caractérisée par un pic unique de concentration durant l'été et l'automne à des profondeurs un peu plus élevées (10-20 mètres) que pour les deux autres lacs.

Les petits eucaryotes autotrophes dénombrés en cytométrie en flux étaient caractérisés par un assemblage hétérogène et une diversité variable au cours de l'année et en fonction du lac (Cellamare *et al.* en préparation). Malgré cela, cette communauté a présenté pour les lacs Léman et du Bourget une dynamique annuelle assez similaire à celle des bactéries hétérotrophes de janvier à octobre. En fin d'année, la concentration de ces nanoeucaryotes autotrophes devenait très faible, quasiment indétectable en cytométrie en flux en dépit de temps d'acquisition relativement long (supérieur à 4 minutes). Malgré la forte reproductibilité des dynamiques interannuelles, les nanoeucaryotes autotrophes ont présenté des concentrations extrêmement faibles toute l'année 2006 dans le lac du Bourget. Dans le lac d'Annecy, la périodicité interannuelle et la durée du pic des nanoeucaryotes autotrophes ont été beaucoup plus variables que dans les deux lacs mésotrophes. En effet, ils ont présenté des pics d'abondance de juin à septembre en 2004, de mai à novembre en 2005 et de juillet à octobre en 2006.

Les picocyanobactéries ont été très abondantes de juillet à novembre entre la surface et 15-20 mètres de profondeur dans les lacs Léman et du Bourget. Elles présentaient une

dynamique relativement similaire dans le lac d'Annecy mais avec toutefois un pic estival plus court dans le temps (juillet à septembre) et plus profond (20-25 mètres). De plus, il était possible de discriminer deux sous-populations au lac d'Annecy en fonction de la profondeur, ce qui n'a jamais été le cas à ce jour pour les deux autres lacs.

Les flagellés et ciliés mixotrophes et hétérotrophes ont présenté des dynamiques plus marquées avec des périodes de plus fortes abondances et de plus longues durées dans le lac du Bourget comparativement au Léman. Néanmoins, la concentration en protozoaires était importante pour ces deux lacs durant toute la période estivale. En 2006, les ciliés ont présenté de très faibles abondances durant toute l'année dans les 2 lacs et comparativement aux deux années précédentes (Fig. IV-3).

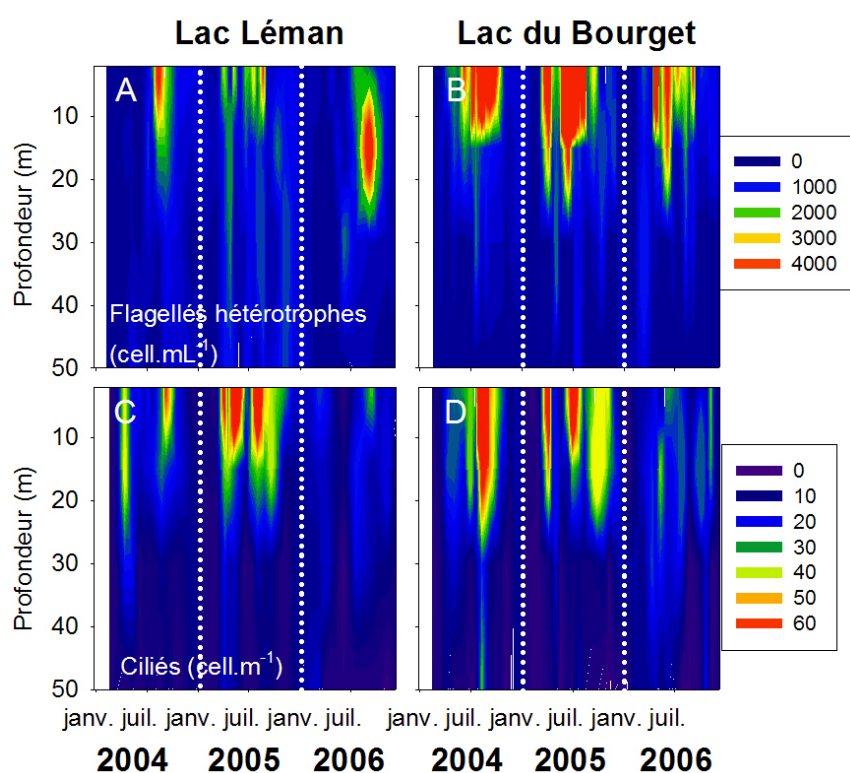


Figure IV-3 : Distribution et évolution des concentrations cellulaires des organismes flagellés hétérotrophes (A, B) et des ciliés (C, D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman et du Bourget.

Dans les lacs Léman et du Bourget, l'évolution temporelle des virus et des bactéries hétérotrophes a été extrêmement similaire, permettant une bonne superposition des deux dynamiques durant l'hiver, l'été et l'automne. En revanche pour le pic bactérien printanier, synonyme de reprise d'activité métabolique après la phase de faible activité hivernale, il n'y avait pas de pic viral concomitant et ceci a été observé durant les trois années d'étude. Les virus n'ont commencé à présenter de fortes abondances qu'à partir du mois de mai jusqu'au

mois d'octobre. Pour le lac d'Annecy, les virus ont révélé une seule période de fortes abondances en 2004 et 2005 mais pas en 2006 ; cette période s'étalant de septembre à décembre en 2004 et d'octobre à janvier en 2005.

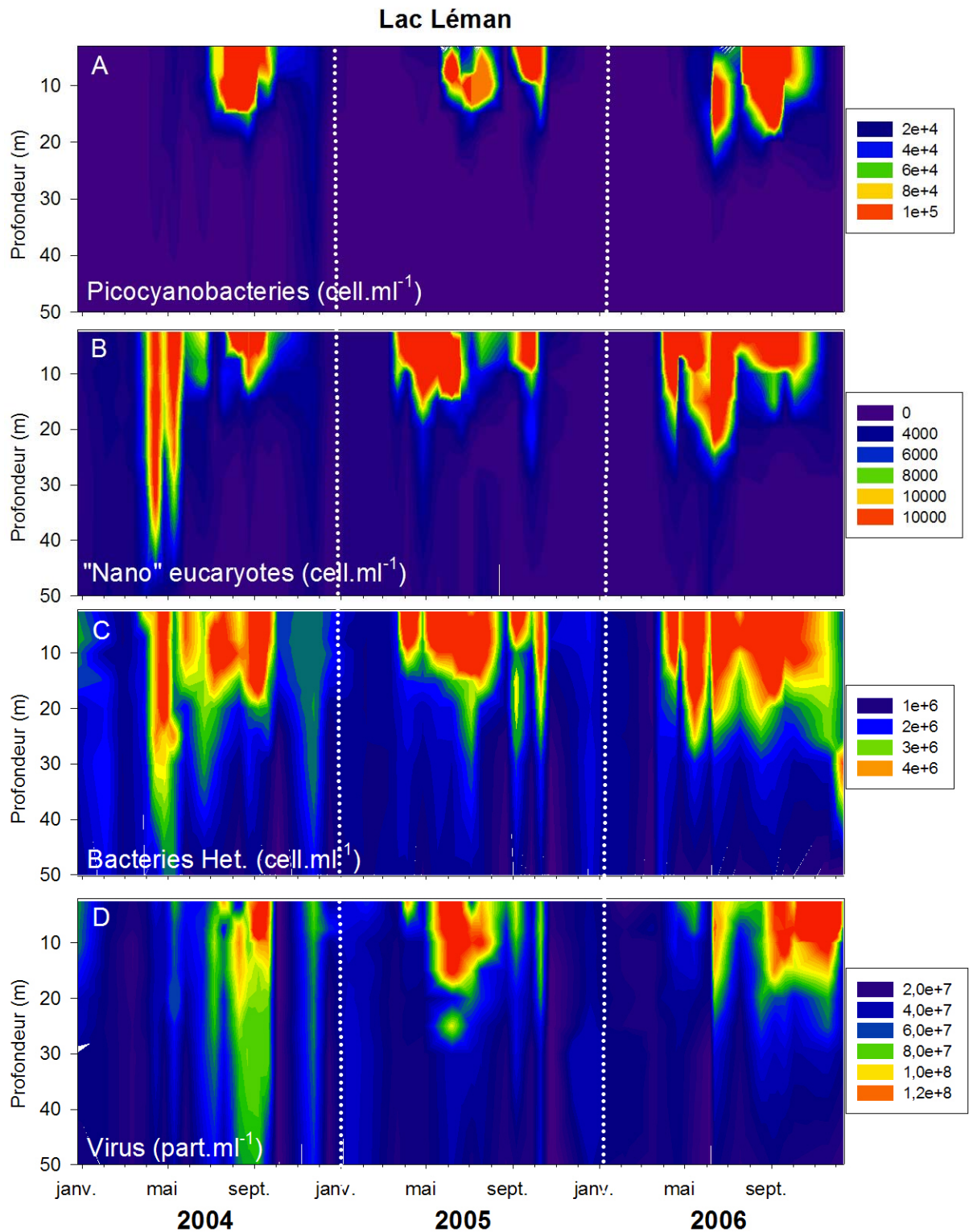


Figure IV-4 : Distribution et évolution des concentrations des picocyanobactéries (A), des petits eucaryotes autotrophes (B), des bactéries hétérotrophes (C) et des virus (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac Léman.

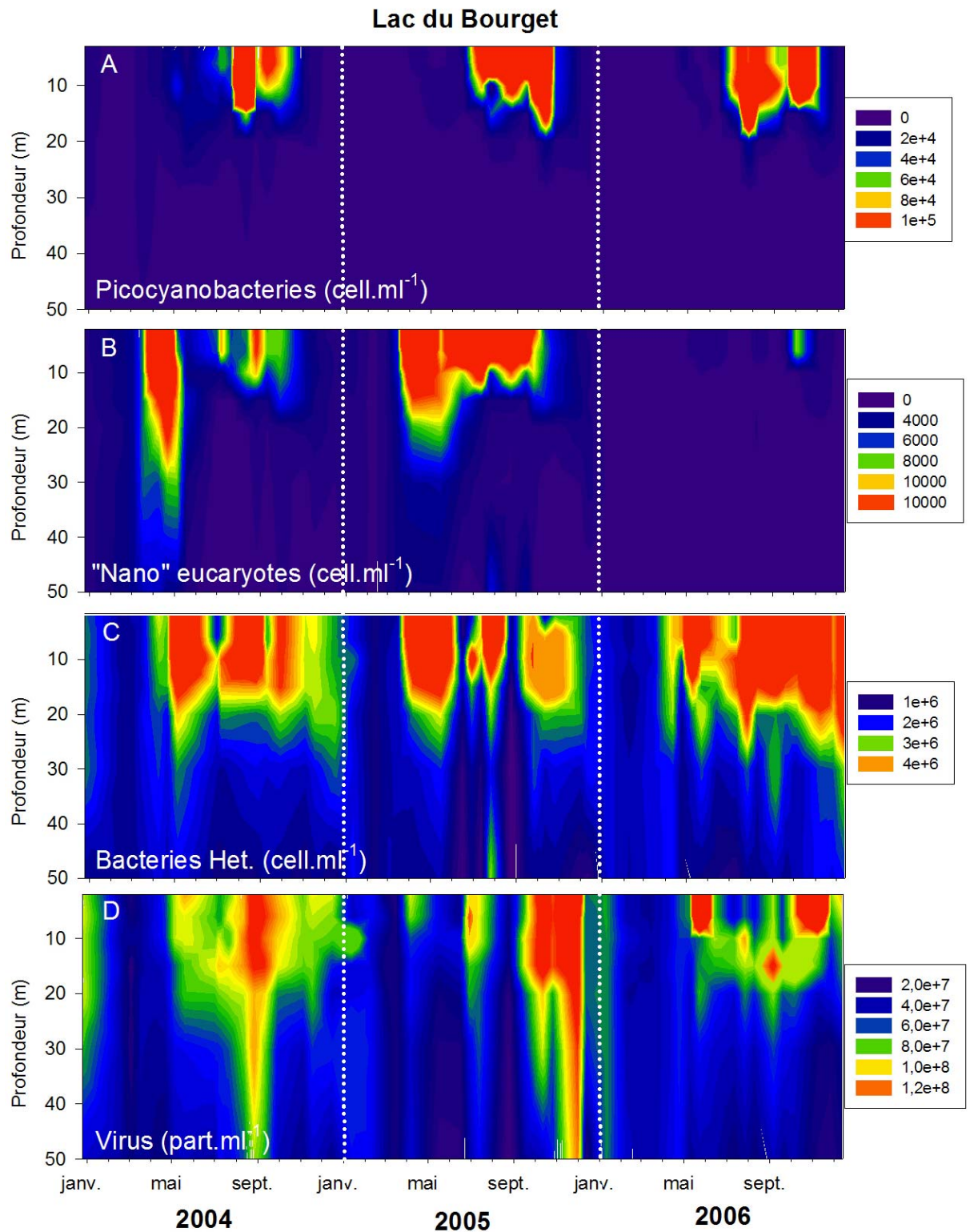


Figure IV-5 : Distribution et évolution des concentrations des picocyanobactéries (A), des petits eucaryotes autotrophes (B), des bactéries hétérotrophes (C) et des virus (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac du Bourget.

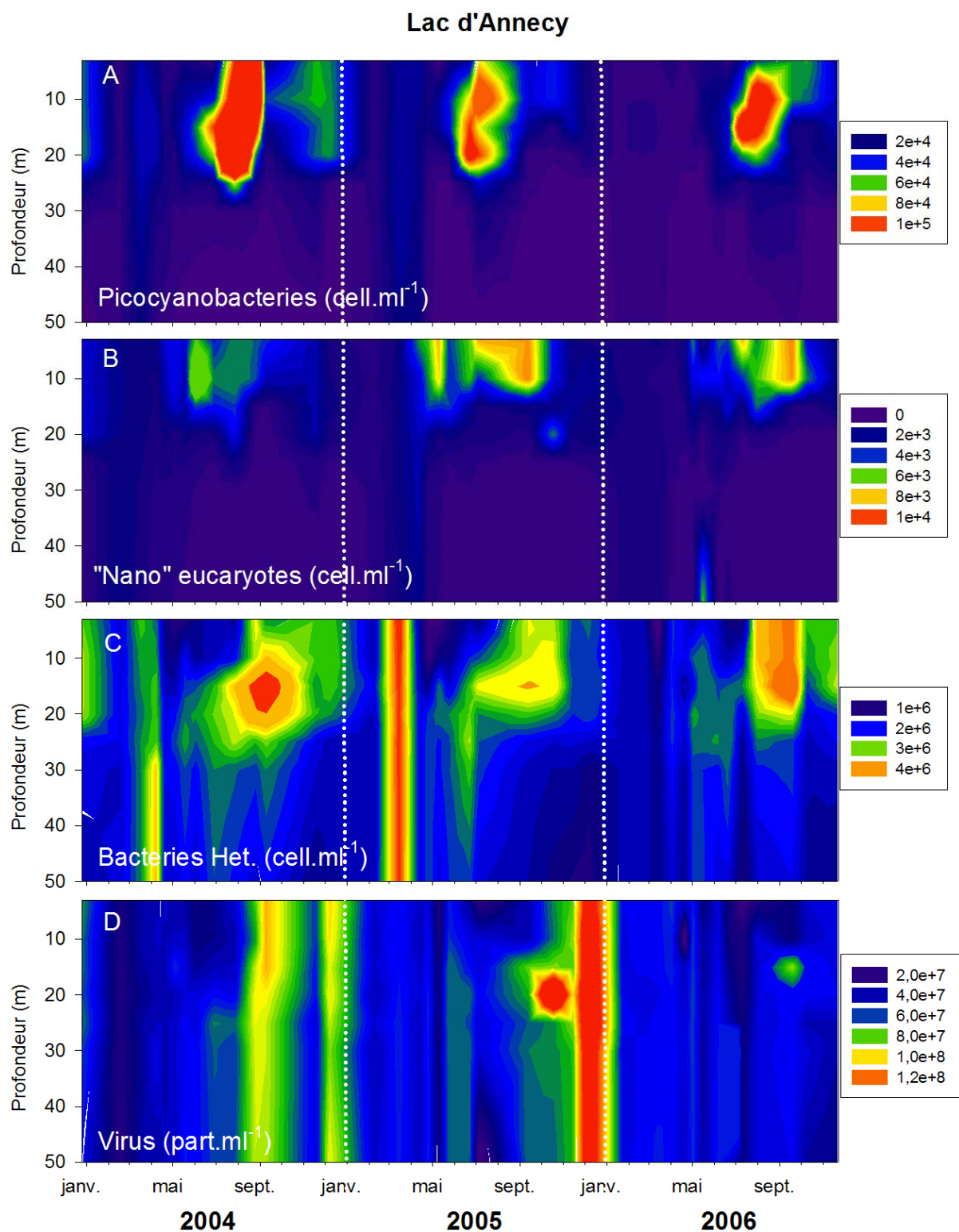


Figure IV-6 : Distribution et évolution des concentrations des picocyanobactéries (A), des petits eucaryotes autotrophes (B), des bactéries hétérotrophes (C) et des virus (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) du lac d'Annecy.

Comme cela a été mentionné précédemment, il a été possible de différencier jusqu'à quatre groupes de virus par cytométrie en flux. Les VLP1 ont représenté entre 92 et 93% (Tableau IV-6) de la communauté virale totale. Les VLP2 ont représenté en moyenne 6% de l'ensemble des virus dans les trois lacs, mais ils ont pu correspondre ponctuellement à une fraction très importante des virus, jusqu'à 22,4% dans le Léman en surface (2,5 mètres) au mois d'octobre 2006 (Tableau IV-6). Les virus nommés VLP3 et VLP4 ont été très largement minoritaires, représentant moins de 1% de l'ensemble des virus en moyenne, mais ponctuellement jusqu'à 3% de l'ensemble des virus dans les lacs Léman et du Bourget au mois d'avril 2005 en surface (2,5 et 7,5 mètres) pour le Léman et au mois de mars 2004 et avril 2006 en surface (2 mètres) pour le lac du Bourget. Dans le lac d'Annecy, ces deux derniers groupes ont pu représenter jusqu'à 10% (VLP3) et 5,2% (VLP4) de la communauté totale au mois de mai 2005 en surface (3 mètres).

Tableau IV-6 : Statistiques descriptives de la part représentative de chaque groupe de virus (VLP1, VLP2, VLP3 et VLP4) sur l'ensemble de la communauté virale dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre 2004 et 2006.

Importance relative des groupes viraux		Léman	Bourget	Annecy
VLP1 (%)	Moyenne	92,62	92,95	92,39
	Ecartype (E-T)	3,22	2,64	4,44
	Max	99,97	99,09	98,36
	Min	75,26	85,39	32,30
	Effectifs (N)	371	324	269
VLP2 (%)	Moyenne	5,97	5,46	6,03
	Ecartype (E-T)	2,91	2,04	3,40
	Max	22,39	11,32	13,09
	Min	0,01	0,78	1,36
	Effectifs (N)	371	324	269
VLP3 (%)	Moyenne	0,59	0,78	0,66
	Ecartype (E-T)	0,46	0,45	0,70
	Max	2,94	2,38	10,68
	Min	0,00	0,07	0,09
	Effectifs (N)	371	324	269
VLP4 (%)	Moyenne	0,82	0,81	0,92
	Ecartype (E-T)	0,47	0,49	0,54
	Max	2,95	3,23	5,17
	Min	0,01	0,05	0,10
	Effectifs (N)	371	324	269

Les différents groupes viraux (VLPs) ont présenté des dynamiques différentes de 2004 à 2006. Compte tenu de l'importance relative des VLP1, la dynamique de ces derniers était très largement représentative de la dynamique de l'ensemble des virus (Fig. IV-4, IV-5, IV-6 et Fig. IV-7, IV-8, IV-9). La dynamique des VLP2 dans les trois lacs s'est distinguée de

celle des VLP1 en présentant des pics de concentration moins profonds (0-20 mètres) et de plus courte durée dans le temps. La dynamique des VLP3 a semblé être un compromis entre les deux premiers groupes. La dynamique des VLP4 s'est distinguée plus nettement des 3 autres groupes, notamment en présentant un pic printanier précoce par rapport à la dynamique des VLP1, et faisant clairement suite au premier développement phytoplanctonique.

Tableau IV-7 : Statistiques descriptives des concentrations virales calculées sur les trois années 2004, 2005, 2006 dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Virus		Léman	Bourget	Annecy
VLP1 (part.mL ⁻¹)	Moyenne	5,52E+07	6,59E+07	5,26E+07
	Ecartype (E-T)	4,64E+07	4,55E+07	3,20E+07
	Max	5,04E+08	3,74E+08	2,19E+08
	Min	4,89E+06	1,01E+07	2,38E+06
	Effectifs (N)	510	443	343
VLP2 (part.mL ⁻¹)	Moyenne	3,51E+06	4,13E+06	3,37E+06
	Ecartype (E-T)	3,82E+06	3,58E+06	2,26E+06
	Max	2,67E+07	2,86E+07	1,88E+07
	Min	2,88E+03	2,93E+05	2,63E+05
	Effectifs (N)	478	443	343
VLP3 (part.mL ⁻¹)	Moyenne	3,29E+05	5,11E+05	3,12E+05
	Ecartype (E-T)	4,02E+05	4,34E+05	1,89E+05
	Max	2,93E+06	2,82E+06	1,01E+06
	Min	0,00E+00	3,83E+04	1,32E+04
	Effectifs (N)	382	324	273
VLP4 (part.mL ⁻¹)	Moyenne	4,48E+05	5,04E+05	4,21E+05
	Ecartype (E-T)	4,32E+05	3,84E+05	1,86E+05
	Max	3,32E+06	2,19E+06	1,25E+06
	Min	2,02E+03	6,06E+04	9,86E+04
	Effectifs (N)	382	324	273

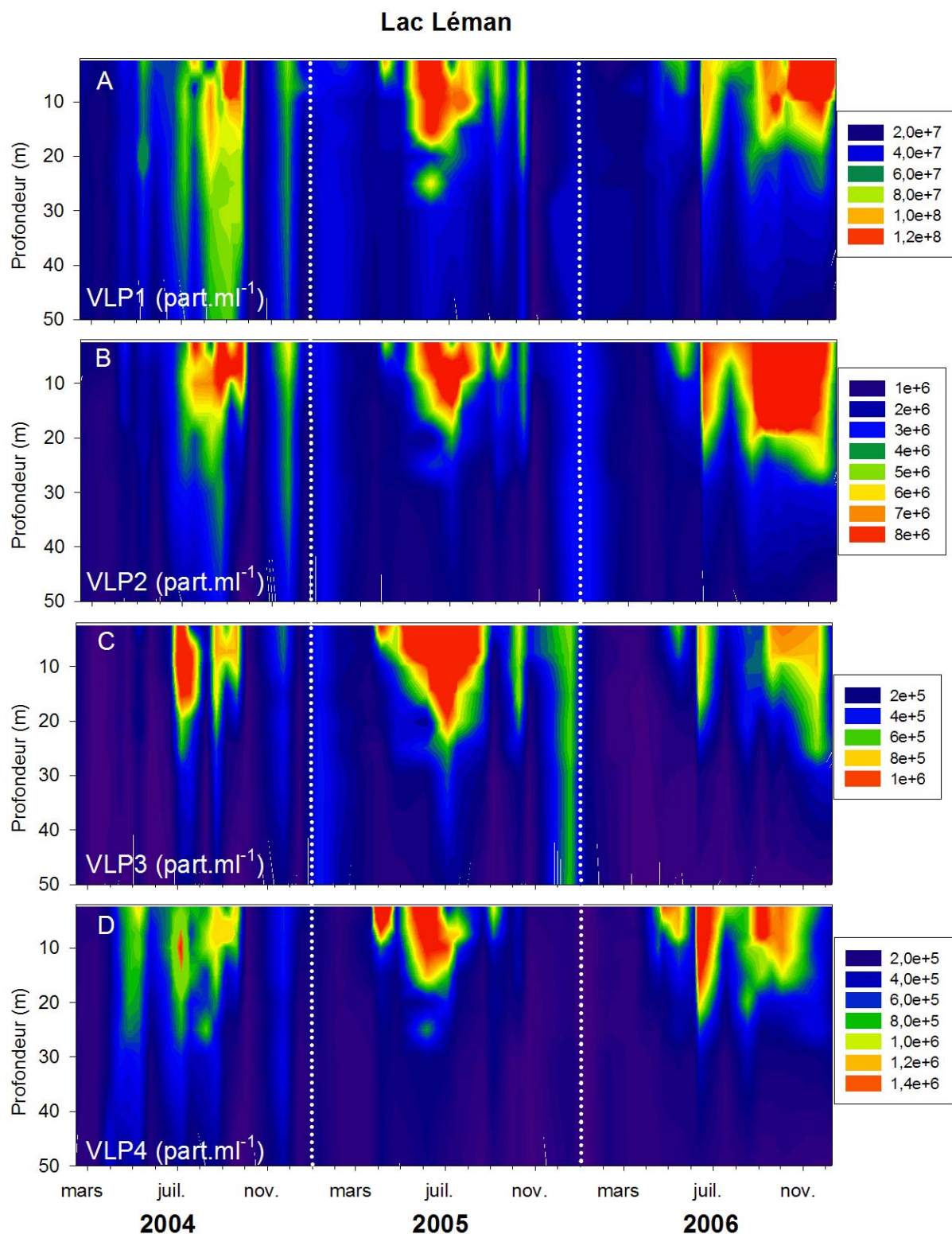


Figure IV-7 : Distribution et évolution des virus VLP1 (A), VLP2 (B), VLP3 (C) et VLP4 (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 dans les eaux de surface (0-50 mètres) du lac Léman.

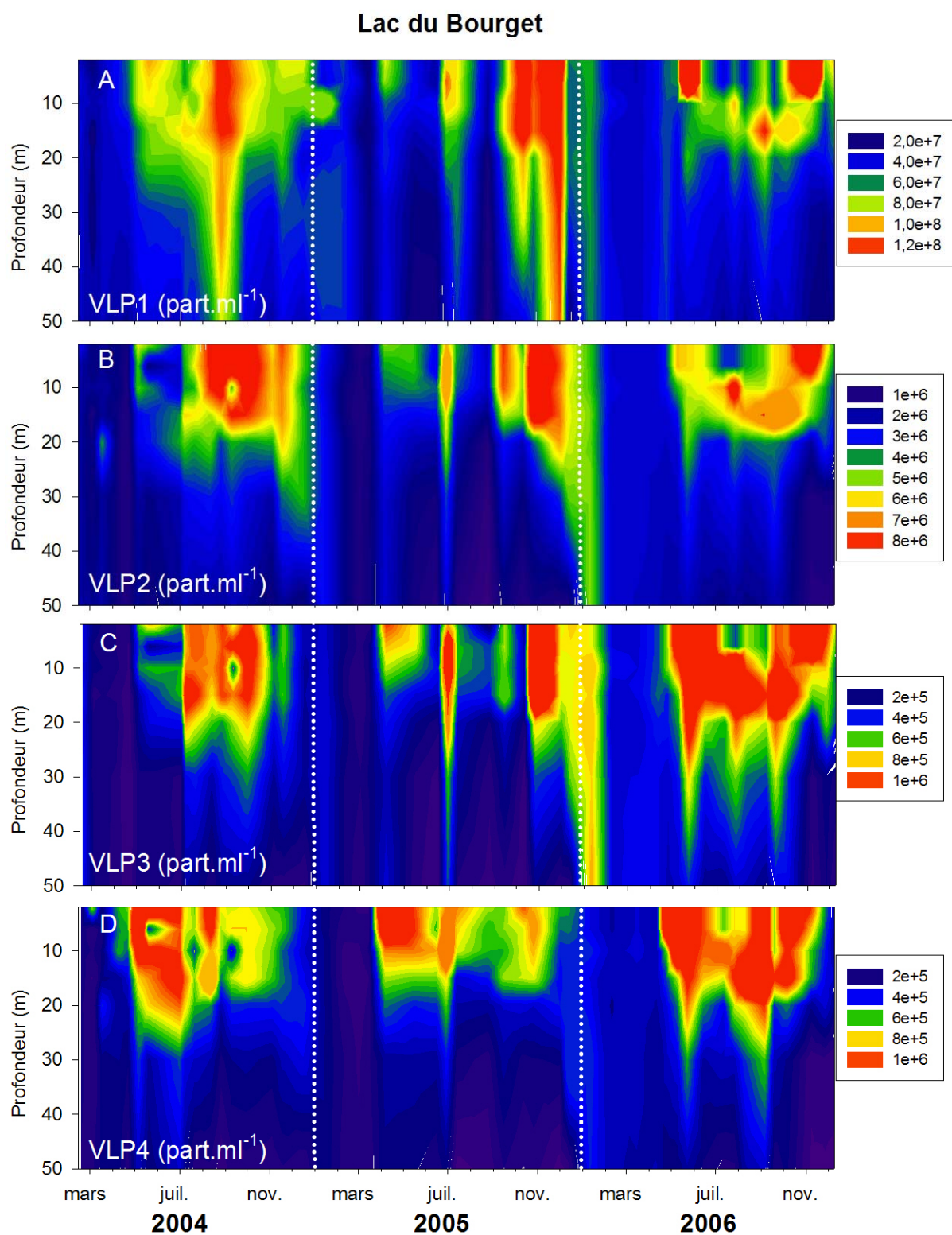


Figure IV-8 : Distribution et évolution des virus VLP1 (A), VLP2 (B), VLP3 (C) et VLP4 (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 dans les eaux de surface (0-50 mètres) du lac du Bourget.

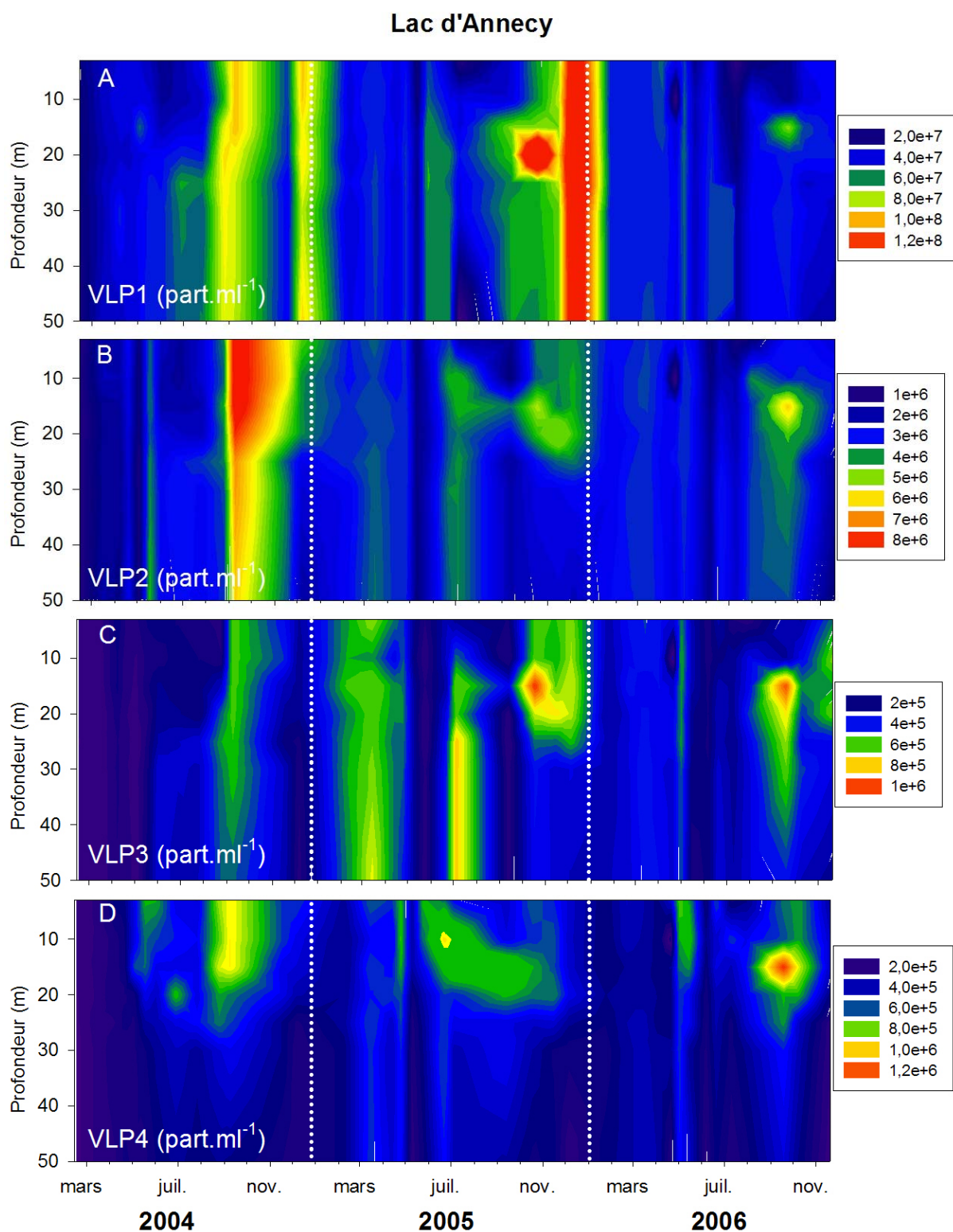


Figure IV-9 : Distribution et évolution des virus VLP1 (A), VLP2 (B), VLP3 (C) et VLP4 (D) entre janvier 2004 et décembre 2006 dans les eaux de surface (0-50 mètres) du lac d'Annecy.

Le rapport entre le nombre de virus et le nombre de bactéries hétérotrophes (appelé VBR pour « virus to bacteria ratio ») est un indicateur couramment utilisé en écologie virale afin de suivre la co-évolution de ces deux communautés. Le suivi de l'évolution du VBR (Fig. IV-10) dans le temps et l'espace (la profondeur) a permis d'apprécier la prédominance de fortes valeurs pour les plus grandes profondeurs (30 et 50 mètres). Le VBR a été extrêmement variable, et il a semblé difficile de pouvoir l'utiliser pour obtenir une information claire sur les variations annuelle ou saisonnière des interactions possibles entre virus et bactéries. Par exemple, au mois de mai 2004, le VBR dans le Léman a atteint la valeur de 30 en surface alors qu'en 2005 et 2006 cette valeur a été divisée d'un facteur 2 pour la même période. En comparant les trois lacs, il a semblé que la variabilité du VBR était plus importante dans le lac du Bourget et le lac d'Annecy (Fig. IV-10). En utilisant les différents groupes viraux, il a été tenté d'affiner cet indicateur et d'utiliser le rapport du nombre de virus de chaque groupe sur le nombre du type de cellules hôtes théoriques. Ainsi, le VCR a donc représenté le nombre de VLP2 divisé par le nombre de picocyanobactéries correspondant et le VER le nombre de VLP4 divisé par le nombre de petites cellules eucaryotes autotrophes correspondant. Le VCR et le VER, comme le VBR, ont présenté de fortes valeurs pour les plus grandes profondeurs (30 et 50 mètres). Il est à noter que le VER, en 2006 et dans le lac du Bourget, a présenté de très fortes valeurs sur toute la colonne d'eau en relation avec l'absence de fortes concentrations des petits eucaryotes autotrophes (Fig. IV-11). La pertinence et la significativité de l'évolution de ces différents paramètres sont discutées dans le chapitre IV.3.d.

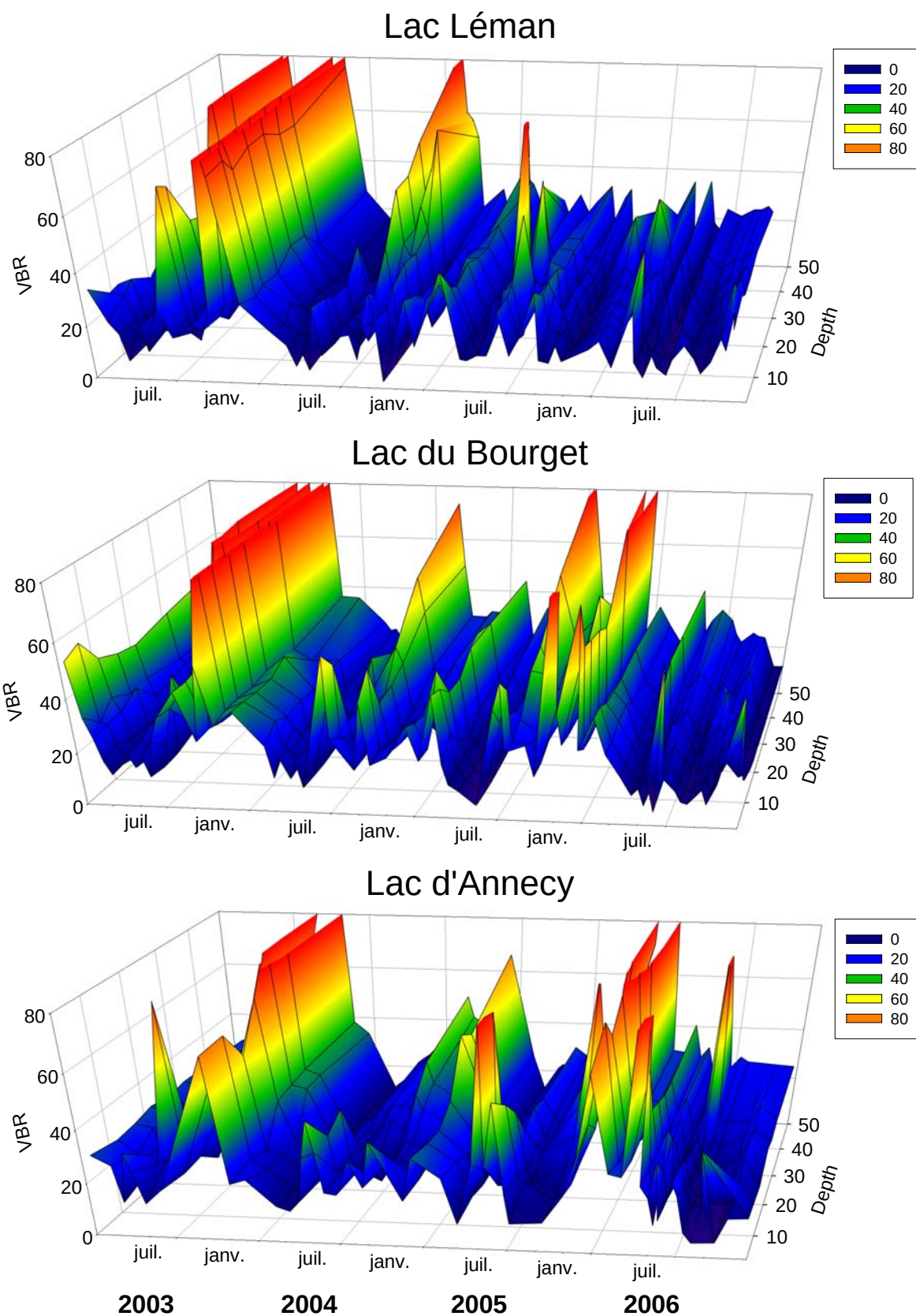


Figure IV-10 : Evolution des VBR (« virus to bacteria ratio ») entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

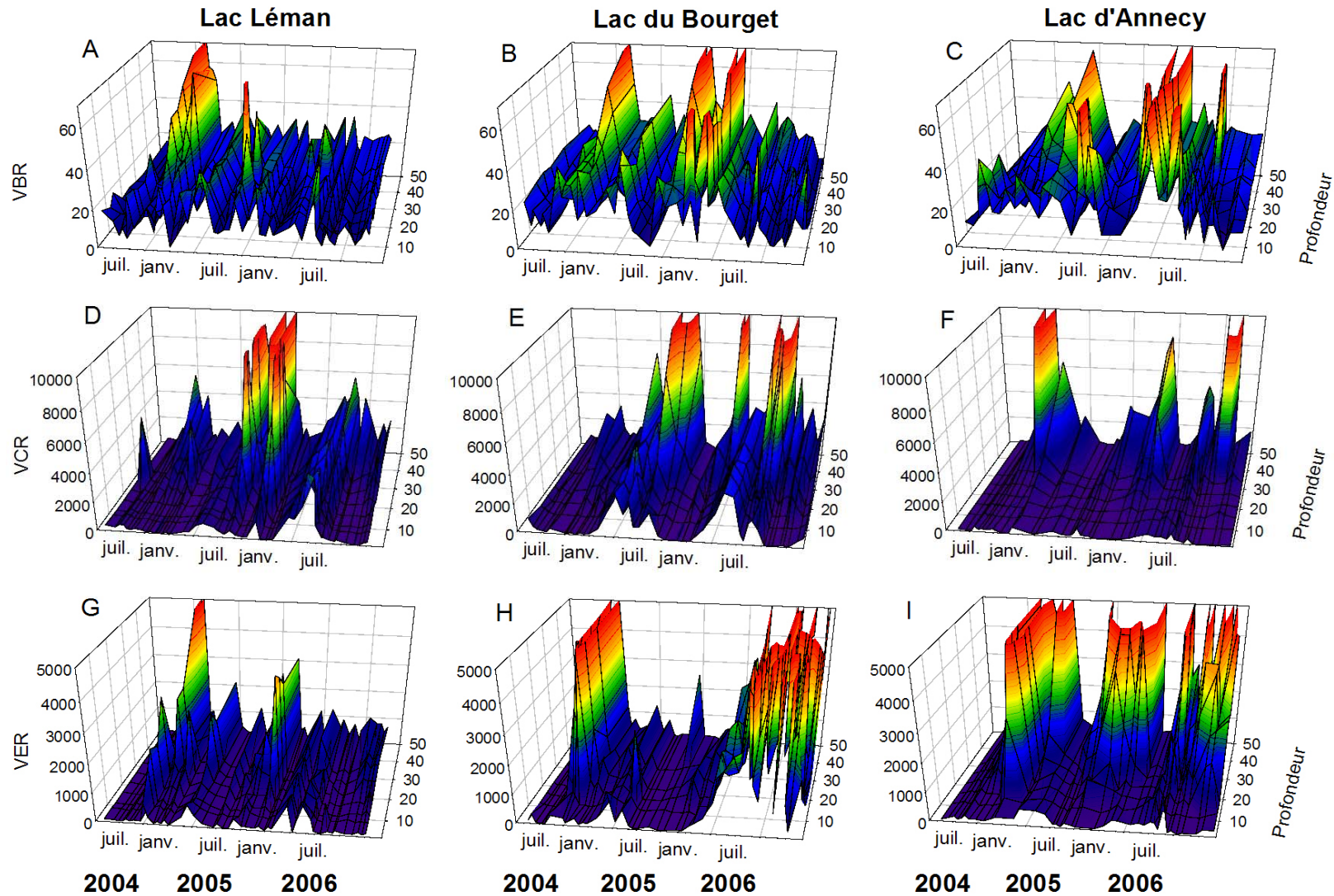


Figure IV-11 : Evolution des VBR (A, B, C), des VCR (D,E,F) et VER (G, H, I) entre janvier 2004 et décembre 2006 des eaux de surface (0-50 mètres) des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

IV.2.c Facteurs explicatifs de la dynamique des communautés microbiennes

Dans un premier temps, à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur, nous avons pu montrer l'effet significatif ($p < 0,05$) de la « profondeur » et également du « temps » sur l'ensemble des paramètres biologiques considérés quelque soit le lac (données non présentées). Compte tenu des différences très nettes entre les abondances et les dynamiques des communautés observées dans les strates épilimniques et hypolimniques, l'analyse statistique a été approfondie en considérant indépendamment l'épilimnion et l'hypolimnion afin d'éliminer l'effet profondeur fortement structurant dans l'analyse de la variance des données.

Approche par régression linéaire multiple

L'objectif a été ici d'identifier (sur la base de régressions linéaires) les relations entre une variable dépendante (à expliquer) et plusieurs variables explicatives choisies parmi les facteurs telles que la température, les teneurs en composés azotés ou phosphorés, les concentrations en chlorophylle *a*, les abondances de prédateurs potentiels, etc.... Ainsi avons-nous recherché, parmi les variables physico-chimiques et biologiques celles susceptibles d'expliquer au mieux les évolutions temporelles des concentrations des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries et des eucaryotes autotrophes dans l'épilimnion et l'hypolimnion des trois lacs péri-alpins. L'utilisation de la régression linéaire « pas à pas » nous a permis de limiter les difficultés d'interprétation des résultats qui peuvent être dues à l'existence de colinéarités entre les variables explicatives choisies (Foucart 2006). Les résultats de chaque régression linéaire multiple ont été détaillés dans les Tableaux IV-8 et IV-9. L'explication de la dynamique temporelle des trois communautés par les variables choisies, a permis de mettre en évidence l'implication d'un plus grand nombre de facteurs dans l'épilimnion (32) par rapport à l'hypolimnion (15), soulignant le caractère plus complexe et multifactoriel des variables structurant le dynamique des communautés dans l'épilimnion. De la même façon, on peut observer l'implication d'un plus grand nombre de facteurs dans le cas du lac d'Annecy (oligotrophe) que dans les deux autres lacs (mésotrophes), laissant suggérer des voies de régulation plus complexes dans le premier écosystème. Les composés chimiques jouent un rôle très important dans l'explication de la variabilité des trois communautés analysées dans le lac d'Annecy, ce qui est moins le cas pour l'épilimnion des lacs Léman et du Bourget et pas du tout le cas pour les échantillons de la zone hypolimnique. On note que les composés azotés (teneurs en ammonium, nitrates) sont souvent repérés comme étant des

paramètres significativement impliqués dans l'explication de la variance des concentrations en bactéries hétérotrophes (en particulier pour les lacs d'Annecy et du Bourget). La température a, quant à elle, été le facteur explicatif clef de la variabilité des picocyanobactéries pour les trois lacs dans l'épilimnion et pour les deux lacs mésotrophes dans l'hypolimnion. Dans les lacs mésotrophes, une étroite corrélation positive entre les petits autotrophes et la chlorophylle a pu être observée dans l'épilimnion. Cette corrélation suggère que les nanoeucaryotes doivent globalement contribuer significativement au compartiment chlorophyllien au sein de ces lacs. Les virus ont été également un facteur important dans l'explication de la variabilité des bactéries hétérotrophes sur toute la colonne d'eau dans les deux lacs mésotrophes. En revanche la régression linéaire multiple n'a pas permis de repérer un tel lien dans le cas du lac d'Annecy. De même, les abondances des flagellés hétérotrophes n'ont pas été des variables significatives dans l'explication de la variabilité des trois communautés étudiées. Seuls les ciliés ont été retenus par l'analyse statistique pour expliquer la variabilité des bactéries hétérotrophes et des picocyanobactéries dans les couches supérieures (épilimnion) du lac Léman. Rappelons ici que nous n'avons pas de données de dénombrement des protistes flagellés et ciliés pour le Lac d'Annecy.

Dans le but d'affiner l'analyse, et en particulier le rôle potentiel des différents types de virus repérés par CMF, le même type de régression a été réalisé en considérant donc chaque groupe viral (VLP) séparément. Si l'on considère l'ensemble du jeu de données, aucune relation significative n'a été observée entre un groupe viral donné et un type de cellules hôtes potentielles. Enfin, la régression linéaire multiple a mis en évidence une forte corrélation entre les bactéries hétérotrophes, les picocyanobactéries et les petits eucaryotes autotrophes suggérant des interactions probablement indirectes et donc une forte co-évolution temporelle de ces trois groupes.

La régression linéaire multiple (RLM) nous a permis de dégager quelques variables explicatives clefs dans les variations des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries et des nanoeucaryotes autotrophes. Cependant, l'utilisation de ce type de test suppose une relation linéaire entre les différentes variables analysées ce qui en écologie n'est pas forcément le cas. Ainsi, une analyse canonique de redondance polynomiale a également été effectuée afin de compléter l'analyse faite par la régression linéaire multiple « pas à pas ». De plus, compte tenu de l'étroite corrélation de co-évolution des dynamiques mise en évidence par la régression linéaire entre les bactéries hétérotrophes, les picocyanobactéries et les nanoeucaryotes autotrophes, il a semblé pertinent de constituer une matrice à expliquer (avec les abondances de bactéries, picocyanobactéries et eucaryotes pigmentés) et une matrice

explicative (avec les paramètres physico-chimiques et biologiques utilisés dans l'analyse RLM) proposée par l'ACRp. Les variables ne sont alors plus considérées de manière dépendante, mais comme un ensemble soumis aux mêmes facteurs de régulation potentiels et donc susceptibles d'être expliquées par les mêmes variables explicatives.

Tableau IV-8 : Valeurs de significativité de l'utilisation des variables explicatives : température (T°C), chlorophylle a (Chla), ammonium (NH₄), nitrate (NO₃), orthophosphates (PO₄), bactéries hétérotrophes (Bact. H.), virus, picocyanobactéries (Picocyanob.) et petits eucaryotes autotrophes (Euc. A.) dans l'explication des variables dépendantes (bactéries hétérotrophes, virus, picocyanobactéries et petits eucaryotes autotrophes) en régression linéaire multiple (pas à pas) pour les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy dans l'épilimnion (0-15 mètres) durant les trois années 2004, 2005, 2006.

Variable dépendante	Variables indépendantes	Lac Léman		Lac du Bourget		Lac d'Annecy	
		P	Sens rég.	P	Sens rég.	P	Sens rég.
Bact. H.	T°C						
	Chla	0,008	+	0,034	-		
	NH ₄			0,011	+	<0,001	+
	NO ₃					0,015	+
	PO ₄			0,017	-		
	Picocyanob.	<0,001	+			<0,001	+
	Euc. A.					0,002	-
	Virus	0,006	+	0,009	+		
	Flagel.						
	Cil.	0,007	+				
Picocyanob.	T°C	<0,001	+	<0,001	+	<0,001	+
	Chla						
	NH ₄	0,036	-			<0,001	-
	NO ₃						
	PO ₄					0,006	-
	Bact. H.	<0,001	+			<0,001	+
	Euc. A.					0,048	+
	Virus						
	Flagel.						
	Cil.	0,023	-				
Euc. A.	T°C						
	Chla	0,001	+	0,037	+	0,018	-
	NH ₄					<0,001	+
	NO ₃			0,023	-		
	PO ₄					<0,001	+
	Bact. H.	<0,001	+			0,001	-
	Picocyanob.					<0,001	+
	Virus					0,009	-
	Flagel.						
	Cil.						

(+) Corrélation positive
(-) Corrélation négative

Tableau IV-9 : Valeurs de significativité de l'utilisation des variables explicatives : température (T°C), chlorophylle a (Chla), ammonium (NH₄), nitrate (NO₃), orthophosphates (PO₄), bactéries hétérotrophes (Bact. H.), virus, picocyanobactéries (Picocyanob.) et petits eucaryotes autotrophes (Euc. A.) dans l'explication des variables dépendantes (bactéries hétérotrophes, virus, picocyanobactéries et petits eucaryotes autotrophes) en régression linéaire multiple (pas à pas) pour les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy dans l'hypolimnion (30-50 mètres) durant les trois années 2004, 2005, 2006.

Variable dépendante	Variables indépendantes	Lac Léman		Lac du Bourget		Lac d'Annecy	
		P	Sens rég.	P	Sens rég.	P	Sens rég.
Bact. H.	T°C	0,005	-				
	Chla						
	NH ₄						
	NO ₃					0,039	+
	PO ₄						
	Picocyanob.	0,01	+			0,009	+
	Euc. A.						
	Virus	<0,001	+	0,011	+		
	Flagel.						
	Cil.						
Cyanob.	T°C	0,015	+	0,017	+		
	Chla						
	NH ₄					0,037	-
	NO ₃						
	PO ₄						
	Bact. H.	0,005	+			0,039	+
	Euc. A.					<0,001	+
	Virus						
	Flagel.						
	Cil.						
Euc. A.	T°C					0,008	-
	Chla						
	NH ₄						
	NO ₃						
	PO ₄						
	Bact. H.	0,003	+				
	Picocyanob.					<0,001	+
	Virus						
	Flagel.						
	Cil.						

(+) Corrélation positive

(-) Corrélation négative

Approche par analyse canonique de redondance polynomiale (ACRp)

Le second travail d'exploration statistique de nos données a été la recherche de facteurs explicatifs sur différents ensembles de variables par l'analyse canonique de

redondance polynomiale. Pour chaque analyse, les données traitées par l'ACRp ont été regroupées au sein de deux matrices, la matrice contenant les variables à expliquer et la matrice contenant les variables explicatives.

Lors d'une première analyse, la matrice à expliquer a été constitué par l'ensemble des communautés microbiennes et la matrice explicative par les facteurs physico-chimiques (variables explicatives). La part de variance expliquée par les résultats de l'ACRp ont été très faibles (entre 20 et 40%) pour l'analyse de ces deux matrices, permettant d'écarter l'hypothèse d'un contrôle unique des communautés microbiennes par les facteurs physico-chimiques.

En modifiant la matrice explicative précédente, c'est à dire en ajoutant les différents groupes viraux, la chlorophylle *a* pour les trois lacs ainsi que les flagellés hétérotrophes et les ciliés pour les lacs Léman et du Bourget, la part de variance explicative a été largement augmentée, pour atteindre des valeurs oscillant entre 50 et 90% (Tableau IV-10 « matrices A »). Prendre en compte des variables biologiques en plus des paramètres physico-chimiques parmi les variables explicatives potentielles a donc permis d'accroître considérablement l'explication de la variabilité des abondances, la distribution et la dynamique des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries et des petits eucaryotes autotrophes dans les trois lacs.

Tableau IV-10 : Type de variables utilisée dans les différentes matrices (matrices « A ») de l'analyse canonique de redondance polynomiale (ACRp) et comparaison du pourcentage total de la variance expliquée par l'analyse canonique de redondance linéaire et polynomiale.

Matrices "A"				
Variables à expliquer	Variables explicatives			
Bactéries Hétérotrophes	VLP1			
Picocyanobactéries	VLP2			
Petits eucaryotes autotrophes	VLP3			
	VLP4			
	Flagellés hétérotrophes			
	Ciliés			
	Température			
	Chlorophylle <i>a</i>			
	N-NH ₄			
	N-NO ₃			
	P-PO ₄			
Pourcentage total de la variance de l'analyse canonique de redondance :		Léman	Bourget	Annecy
Epilimnion	Régression Linéaire	68%	45%	27%
	Régression Polynomiale	90%	76%	58%
Hypolimnion	Régression Linéaire	53%	19%	36%
	Régression Polynomiale	86%	48%	62%

La répartition de l'ensemble des données analysées par ACRp (Figure IV-12) a permis d'observer très nettement une structuration en fonction des dates d'échantillonnage dans l'épilimnion, permettant d'isoler la période stratifiée (mai à octobre-novembre) et la période de brassage des eaux (décembre à mars-avril) pour les trois lacs. Cette structuration n'apparaît pas à l'issue de l'analyse des résultats de l'ACRp pour l'hypolimnion (Figure IV-13). Dans l'épilimnion, l'analyse par l'ACRp a également permis de mettre en évidence la forte reproductibilité interannuelle de dispersion des données. En effet, on observe un positionnement très proche (sur la projection graphique) pour des mêmes mois issus d'années différentes. Les bactéries hétérotrophes se positionnent généralement en position centrale dans les différents diagrammes de dispersion, ce qui suggère que leurs dynamiques sont liées à de très nombreux facteurs ayant globalement des poids assez comparable dans l'explication de la dynamique des abondances bactériennes. Dans l'épilimnion et l'hypolimnion, les facteurs explicatifs choisis pour constituer les matrices ont été étroitement corrélés aux bactéries hétérotrophes et aux petits eucaryotes, permettant d'expliquer une grande part de la variabilité de ces deux communautés dans les lacs Léman et du Bourget. Dans le lac d'Annecy, toujours pour l'épilimnion et l'hypolimnion, les résultats ont été similaires, avec néanmoins une répartition plus dispersée des facteurs explicatifs, soulignant une fois encore la différence prononcée entre ce lac et les deux autres (Fig. IV-12, IV-13). La variabilité des picocyanobactéries n'a pu être expliquée par les paramètres choisis puisqu'aucune corrélation avec les variables explicatives n'a été obtenue à l'issue de l'ACRp sur les différents diagrammes de dispersion. Les virus, essentiellement les VLP1, n'ont pas été identifiés comme variable explicative par l'ACRp, les plaçant même systématiquement en opposition avec les bactéries hétérotrophes et les petits eucaryotes sur les diagrammes de dispersion. Une hypothèse simple a été formulée ici, en disant que ce ne sont pas les virus qui expliquent la variabilité observée dans la dynamique des communautés microbiennes mais ce sont les différentes communautés microbiennes qui expliquent les variations d'abondances virales. Afin de tester cette hypothèse, deux nouvelles matrices (matrices « B ») ont été créées : (i) la matrice à expliquer composée des différents groupes viraux, (ii) la matrice explicative composée des communautés microbiennes (hôtes potentielles) plus les paramètres physico-chimiques (facteurs de forçage importants).

Tableau IV-11 : Type de variables utilisée dans les différentes matrices (matrices « B ») de l'analyse canonique de redondance polynomiale (ACRp) et comparaison du pourcentage total de la variance expliquée par l'analyse canonique de redondance linéaire et polynomiale.

Matrices "B"				
Variables à expliquer	Variables explicatives			
VLP1	Bactéries Hétérotrophes			
VLP2	Picocyanobactéries			
VLP3	Petits eucaryotes autotrophes			
VLP4	Température			
	Chlorophylle a			
	N-NH ₄			
	N-NO ₃			
	P-PO ₄			
Pourcentage total de la variance de l'analyse canonique de redondance :				
		Léman	Bourget	Annecy
Epilimnion	Régression Linéaire	35%	25%	31%
	Régression Polynomiale	67%	63%	71%
Hypolimnion	Régression Linéaire	70%	84%	19%
	Régression Polynomiale	77%	90%	43%

A la différence des résultats obtenus pour l'analyse des matrices A, la structuration en 2 zones distinctes (stratifiée / non stratifiée) de l'épilimnion n'a pu être mise en évidence pour les matrices B, dans les deux lacs du Bourget et d'Annecy et, elle apparaît de manière beaucoup moins nette dans le cas du Léman (Fig. IV-14, IV-15). Cette absence de représentation de la période de stratification dans les diagrammes de dispersion souligne le caractère moins saisonnier (lié au réchauffement de la masse d'eau) et probablement beaucoup plus complexe de la dynamique virale par rapport aux autres communautés microbiennes. L'analyse des diagrammes de dispersion a également permis de mettre en évidence d'assez bonnes corrélations entre les VLP1 et les bactéries hétérotrophes dans l'épilimnion (Fig. IV-14) alors que ces corrélations ont été beaucoup moins nettes dans l'hypolimnion (Fig. IV-15). Pour les VLP2 et VLP4, c'est uniquement dans l'hypolimnion (Fig. IV-15) que ces deux groupes sont associés aux picocyanobactéries alors que dans l'épilimnion et l'hypolimnion on observe une corrélation inverse avec les petits eucaryotes autotrophes et les bactéries hétérotrophes. Dans l'épilimnion, les bactéries hétérotrophes ont donc été un très bon facteur d'explication de la variance de la dynamique des VLP1, alors que pour les autres groupes de VLP l'explication de la variabilité par une autre communauté potentiellement hôte n'est pas clairement mise en évidence ici. Cette analyse statistique par ACRp a également permis de démontrer l'étroite similitude dans l'explication de la variabilité des VLP au niveau de l'hypolimnion pour les trois lacs en fournissant des diagrammes de dispersion similaires (Fig. IV-15).

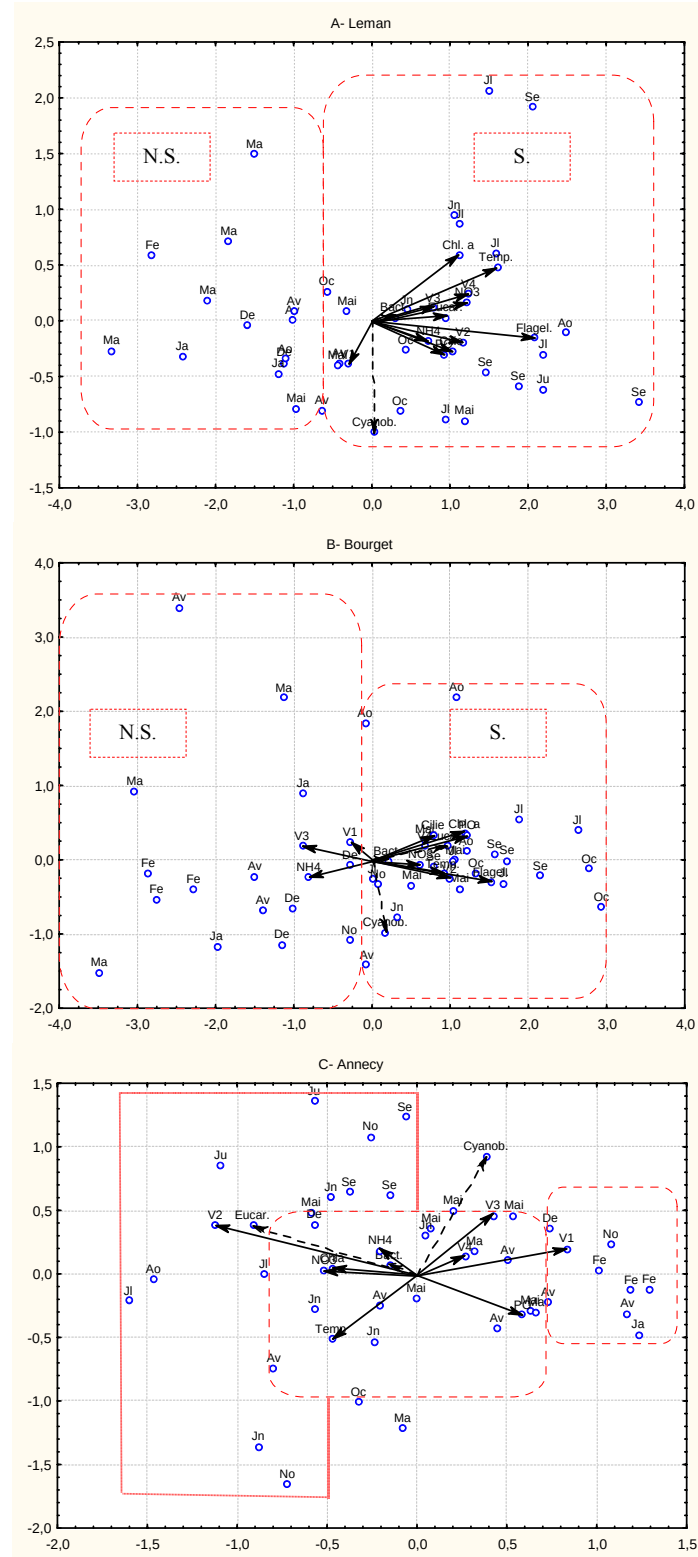


Figure IV-12 : Diagramme de dispersion des données de l'épilimnion des matrices « A » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour les lacs Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillées les variables à expliquer. Les zones en pointillées délimitent les périodes non stratifiées (N.S.) et stratifiées (S) de la colonne d'eau.

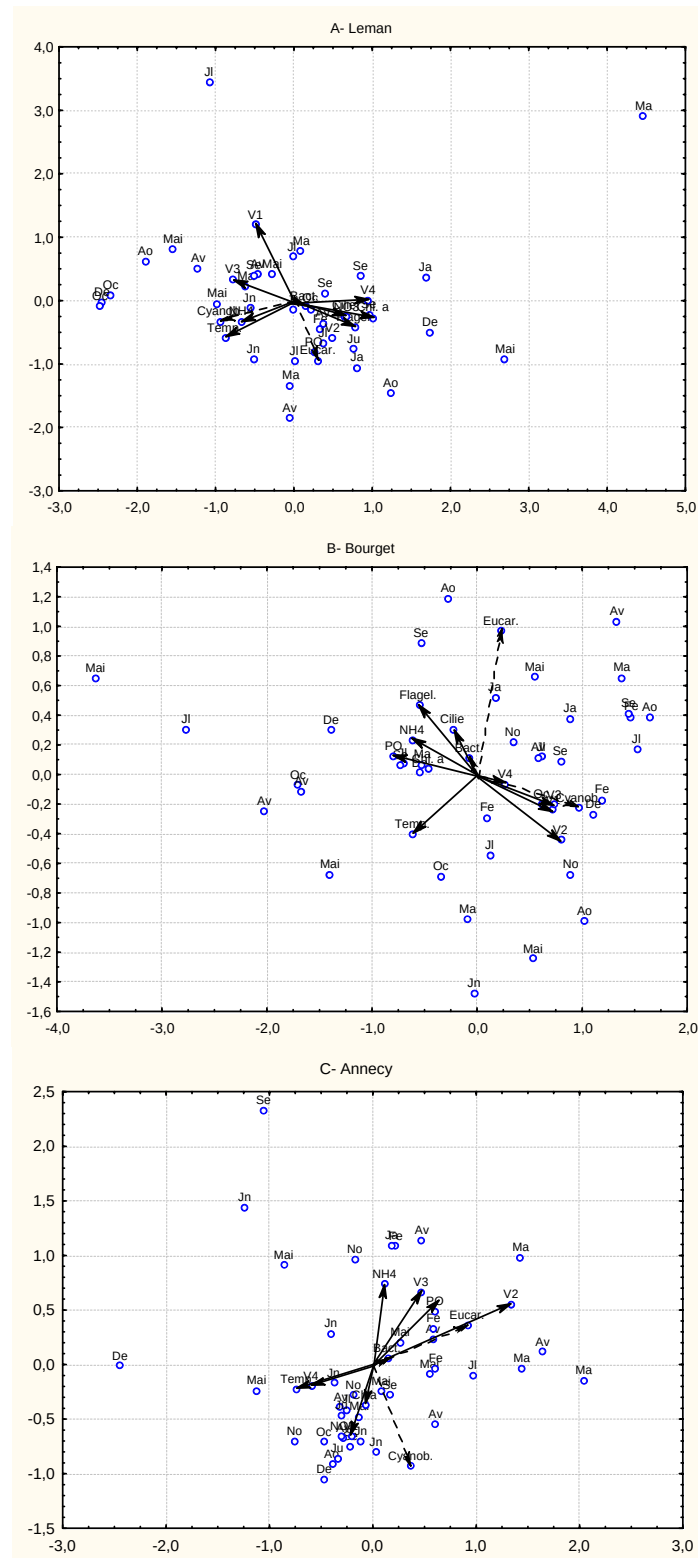


Figure IV-13 : Diagramme de dispersion des données de l'hypolimnion des matrices « A » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour les lacs Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer.

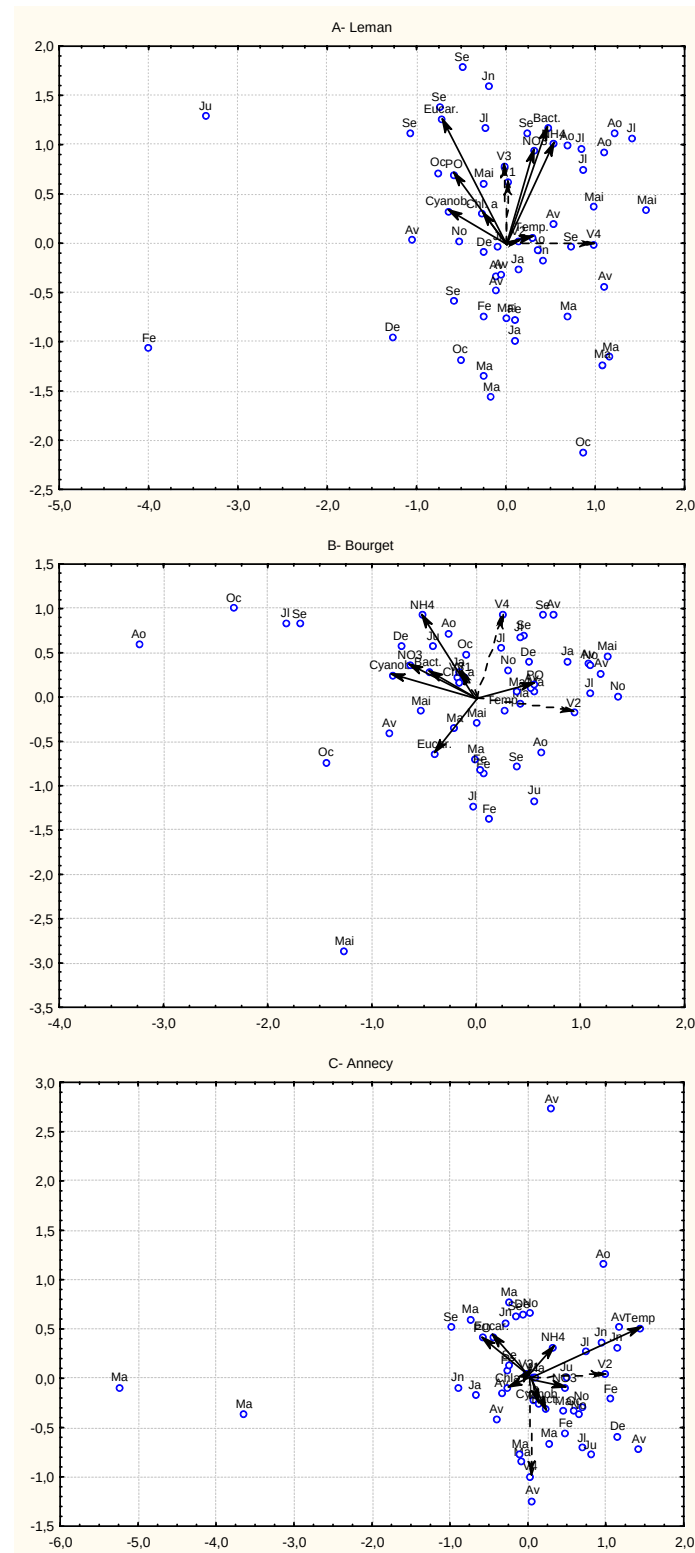


Figure IV-14 : Diagramme de dispersion des données de l'épilimnion des matrices « B » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour les lacs Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer.

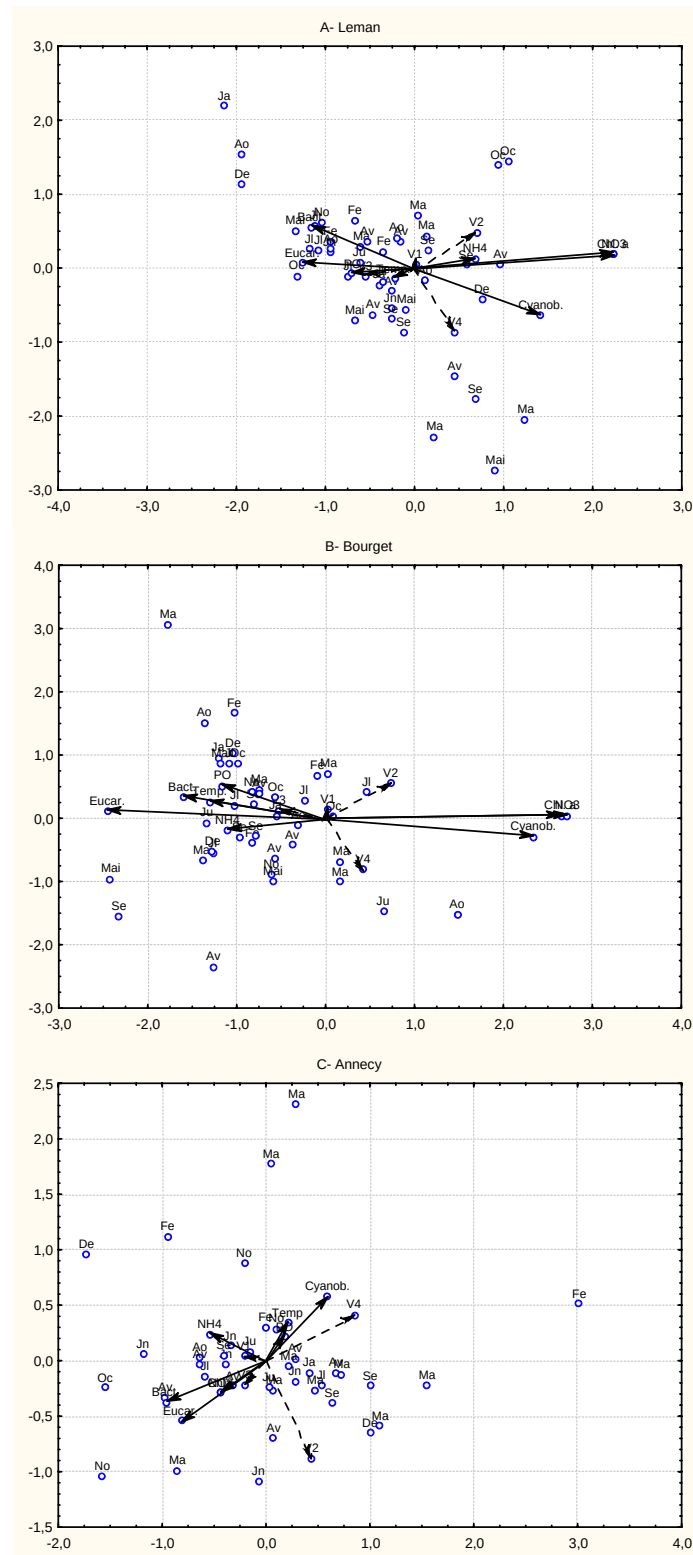


Figure IV-15 : Diagramme de dispersion des données de l'hypolimnion des matrices « B » : résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale pour les lacs Léman (A), du Bourget (B) et d'Annecy (C). Les points représentent les différents mois d'analyses, référencés par leurs deux premières lettres. Les flèches pleines représentent les variables explicatives et les flèches en pointillés les variables à expliquer.

IV.3 Synthèse et discussion sur le suivi de la dynamique des communautés microbiennes

IV.3.a La RLM et l'ACRp pour appréhender les relations statistiques et le déterminisme de la dynamique des communautés microbiennes

L'approche multivariable, par des méthodes telles que la régression linéaire multiple et l'analyse canonique des redondances (ACR), a été utilisée pour préciser la nature des liens entre les variations observées dans la dynamique des communautés microbiennes et les facteurs environnementaux susceptibles d'expliquer ces dynamiques. Les relations statistiques obtenues à l'aide de ces deux types d'analyse nous ont permis d'identifier les paramètres physico-chimiques et biologiques plus particulièrement impliqués dans l'explication de la variance des données d'abondance des bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries et nanoeucaryotes. La régression linéaire a été largement utilisée comme outil d'analyse statistique dans l'explication de la variabilité de l'ensemble des communautés microbiennes (Almeida *et al.* 2001, Bettarel *et al.* 2004, Pradeep-Ram *et al.* 2005, Brum *et al.* 2005). Grâce à ces méthodes, Brum *et al.* (2005) ou Almeida *et al.* (2001) pour exemples ont pu relier significativement l'évolution des bactéries hétérotrophes et celle des virus dans le lac Mono (Californie) et l'estuaire de Ria de Aveiro (Portugal). Cependant, les informations obtenues dans ces études ont largement fait état de la faible portée de ce type de tests, montrant clairement la nécessité d'utiliser d'autres outils statistiques pour augmenter notre compréhension des interactions entre les communautés et leur environnement. C'est une des raisons pour lesquelles nous nous sommes tournés vers les méthodes d'ordination. Parmi ces méthodes, l'ACR (analyse canonique de redondance) nous a permis de considérer deux tableaux de données, un premier tableau (Y) contenant les variables-réponse (les abondances des communautés microbiennes étudiées) et un second (X) contenant les variables explicatives (les variables environnementales, les abondances des parasites ou prédateurs potentiels). L'ACR classique impose des contraintes linéaires entre les variables X et Y, ce qui reflète rarement les processus naturels. Sur le principe de la méthode proposée par Makarenkov & Legendre (2002), nous avons alors utilisé une ACR polynomiale basée sur un algorithme de régression polynomiale, permettant de passer outre les contraintes de linéarité dans la description des relations entre les variables de la matrice à expliquer (X) et celle de la matrice explicative (Y). Par rapport au modèle linéaire classique, cette approche nous a permis d'augmenter significativement le pourcentage de variance de Y expliqué par le modèle (environ 70% alors que l'approche linéaire n'en expliquait que 43%, Tableau IV-10).

Qualitativement, les deux tests statistiques (RLM et ACRp) ont fourni à la fois des informations qui ont été, parfois similaires et dans d'autres cas complémentaires pour la compréhension de la variabilité des communautés microbiennes (voir chapitre IV.3.c). Ainsi, ils ont mis en évidence une étroite relation de l'ensemble des facteurs explicatifs avec les communautés microbiennes dans l'épilimnion ainsi qu'une faible relation de ce type dans l'hypolimnion. Ils ont également démontré les différences dans l'importance des paramètres explicatifs entre le lac oligotrophe et les deux lacs mésotrophes dans l'interprétation de la variabilité microbienne, avec une prédominance des facteurs chimiques par RLM et une répartition différente des variables explicatives dans le diagramme de dispersion par ACRp pour le lac d'Annecy. De manière complémentaire, l'ACRp a clairement opposé les périodes stratifiées et non stratifiées (dans l'épilimnion) structurant fortement les communautés, ainsi que la forte reproductibilité interannuelle de dispersion des données, ce qui n'a pas été envisageable avec la RLM. Enfin, la RLM a permis d'obtenir une régression statistiquement significative entre les bactéries hétérotrophes et les virus dans les deux lacs mésotrophes alors que l'ACRp n'a pas mis étroitement en lien la variabilité des bactéries hétérotrophes et des virus. La RLM a identifié la température comme un paramètre déterminant pour expliquer la dynamique des picocyanobactéries alors que l'ACRp n'a mis en évidence aucun facteur explicatif très étroitement associé à la dynamique de ces microorganismes. Ces deux approches différentes ont donc été nécessaires afin d'acquérir dans un premier temps des résultats à interprétation simple et rapide par la RLM. Dans un second temps, par l'ACRp, nous permet d'envisager des relations plus complexes et probablement plus proches des relations pouvant exister entre les différents paramètres physiques, chimiques et microbiens (voir chapitre suivant). L'utilisation d'un ou plusieurs outils statistiques s'est donc révélée utile compte tenu du large jeu de données acquis et nous a permis d'aller au-delà d'une simple analyse descriptive.

IV.3.b Les facteurs biologiques et physico-chimiques déterminants dans l'évolution des dynamiques microbiennes

Notre étude a clairement mis en évidence la reproductibilité des dynamiques microbiennes d'une année à l'autre et également de fortes variations temporelles au cours de l'année dans les trois lacs péri-alpins. Une structuration très nette des communautés microbiennes selon la saison, en fonction du brassage des eaux, et selon la profondeur, épilimnion/hypolimnion, a pu être clairement identifiée. Quelques références bibliographiques

rapportent le fait qu'une abondance moyenne bactérienne relativement stable peut masquer des variations spatiales et temporelles pouvant être importantes (Servais *et al.* 1995, Guillou *et al.* 1999). En particulier sur le lac Léman, Dufour *et al.* (1986) ont précédemment mis en évidence les variations d'abondance observées pour les bactéries hétérotrophes entre l'épi- et l'hypolimnion en fonction des périodes de l'année. Nos dénombrements acquis en cytométrie en flux ont permis d'acquérir un jeu de données très complet qui confirment et affinent les observations faites sur d'autres écosystèmes profonds concernant la dynamique des bactéries hétérotrophes (Lavandier 1990, Servais *et al.* 1995) et les picocyanobactéries (Weisse & Kenter 1991, Callieri & Stockner 2002).

L'évolution de la distribution verticale des communautés microbiennes, à l'échelle d'une année, est clairement liée aux facteurs de forçage physiques, toutefois, ceux-ci n'ont pas été les seuls à jouer un rôle déterminant dans la distribution et l'évolution temporelle des communautés microbiennes. Ainsi, la dynamique de chaque communauté microbienne considérée dans notre étude a été également déterminée par les facteurs ou processus chimiques et biologiques, pouvant être différents suivant que l'on s'intéresse aux bactéries hétérotrophes, aux picocyanobactéries ou aux petits eucaryotes autotrophes. L'importance de ces facteurs de régulation (chimiques et biologiques) variait en fonction du statut trophique des lacs péri-alpins et des périodes de l'année.

Les facteurs chimiques comme facteurs explicatifs dans l'évolution des dynamiques microbiennes

L'effet structurant des paramètres chimiques sur les communautés a pu être mis en évidence au travers de la comparaison effectuée entre un système oligotrophe (i.e le lac d'Annecy) et 2 lacs mésotrophes (Léman et Bourget). Il est aujourd'hui reconnu que les éléments nutritifs inorganiques peuvent contrôler l'abondance et la diversité des bactéries (Lebaron *et al.* 1999, Schafer *et al.* 2001, Thingstad *et al.* 2007). Toutefois les comparaisons inter – études sont parfois rendues délicates en raison de la diversité des méthodes d'analyses et d'échantillonnages. Nous avons pu, dans le cadre de nos travaux, nous affranchir de ces problèmes compte tenu de la similarité des méthodes et du nombre important de données acquises. Nos résultats montrent que les communautés microbiennes ont été quantitativement moins importantes dans le lac oligotrophe qui présente des concentrations moyennes deux et dix fois inférieures en N-NO₃ et P-PO₄. Préalablement Wommack & Colwell (2000), Gasol & Duarte (2000) avaient effectuées des observations semblables pour d'autres systèmes

oligotrophes. L'approche statistique a clairement révélé que l'influence de ces composés chimiques (notamment l'élément P) est déterminante pour expliquer la variabilité des communautés microbiennes dans le lac d'Annecy. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Hessen (1992), Zweifel *et al.* (1993), Pomeroy *et al.* 1995 qui ont désigné le phosphore comme élément clef du contrôle de la communauté bactérienne, communauté centrale (voir résultat de l'ACRp) dans l'explication de la variabilité des communautés microbiennes. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que des approches expérimentales menées au sein de notre équipe (Akin 2006) ont permis de confirmer que le Phosphore sous sa forme bio-disponible est en effet un élément majeur, limitant l'activité et la croissance bactérienne dans le lac d'Annecy. Brièvement, des expériences ont été menées sur les communautés bactériennes du lac d'Annecy, basées sur des enrichissements croisés en phosphates (1, 8 et 60 μM), en nitrates, ammonium et urée (30 μM) dans des enceintes expérimentales en hiver et au printemps 2006. Les résultats majeurs portant sur l'analyse des abondances, de l'activité et de la diversité bactérienne ont mis en évidence des différences significatives entre traitements après 48 heures d'incubation avec typiquement (i) l'augmentation des abondances bactériennes pour les forts enrichissements en P ; (ii) de plus faibles augmentations des concentrations avec les traitements en azote ; (iii) l'importance relative de la source d'azote selon la date du prélèvement ; (iv) une composition bactérienne qui évolue sensiblement avec les différents traitements mettant en évidence des changements de diversité bactérienne. Les résultats de cette étude ont clairement démontré que le phosphore est sans nul doute un élément limitant et structurant pour la communauté bactérienne hétérotrophe dans le lac d'Annecy confirmant les hypothèses suggérées par nos propres analyses et confirmant des résultats rapportés pour d'autres lacs (Toolan *et al.* 1991, Carlson & Caron 2001).

D'autre part, l'effet structurant des paramètres chimiques sur les communautés a pu être mis en évidence également à l'échelle intra-lac, en considérant les liens entre évolutions des teneurs en nutriments minéraux et dynamique des communautés au cours de l'année. Le lien entre certains éléments comme les ions ammonium et l'abondance bactérienne peut être expliqué par le fait que ces composés sont des produits de minéralisation, certaines souches bactériennes peuvent jouer un rôle direct crucial dans les cycles biogéochimiques et notamment celui de l'azote (Tadonlélé 2007). De plus les éléments minéraux (N, P) sont, comme nous l'avons évoqué ci avant, des ressources nutritives importantes utilisées surtout par les autotrophes mais aussi par les communautés bactériennes hétérotrophes. Ainsi, la dynamique de ces ressources nutritives structurent, de manière plus ou moins importante selon la période, la croissance des micro-organismes via la remise à disposition des

nutriments pendant le brassage, le recyclage et redistribution liés à des lyses ou fin de blooms, etc... Les concentrations en N-NO_3 et P-PO_4 ont par exemple été visiblement un élément limitant dans le lac d'Annecy au printemps et en été, avec pour conséquence probable de limiter la croissance phytoplanctonique et ainsi diminuer la production de matière organique nécessaire au développement des bactéries hétérotrophes. Les phénomènes mis en jeu ici sont donc des processus biologiques influençant directement ou indirectement la quantité (et probablement la qualité) des ressources nutritives disponibles.

Les facteurs et interactions biologiques indirectes comme facteurs explicatifs dans l'évolution des dynamiques microbiennes

L'ACRp a constamment associé les bactéries hétérotrophes et les petits eucaryotes autotrophes mettant en évidence leurs fortes « co-évolutions » (spatio-temporelles) expliquées par les facteurs physico-chimiques mais également soumises à des facteurs de régulation biologiques. Il est probable que, tout au long de l'année, des interactions fortes s'établissent entre ces deux communautés de par leurs activités métaboliques à bénéfices réciproques. La synthèse et libération de matière organique par les eucaryotes autotrophes fournissent une ressource utilisable aux décomposeurs, et à l'inverse, l'activité de re-minéralisation des bactéries hétérotrophes permet une remise à disposition d'éléments nutritifs minéraux, nécessaires au développement phytoplanctonique. Cole *et al.* (1982), Bell *et al.* (1983), Baines & Pace (1991), White *et al.* (1991), Sundh & Bell (1992) ont démontré que la matière organique excrétée par le phytoplancton au cours de l'activité photosynthétique représente une source importante de carbone pour les bactéries hétérotrophes, excepté dans les systèmes soumis à de forts apports allochtones tels que les lacs humiques (Tranvik 1988, Tranvik & Sieburth 1989, Sundh & Bell 1992, Tulongen *et al.* 1992), ce qui n'est pas le cas ici. De plus, par des approches écosystémiques, Méthé & Zehr (1999), Lindstrom & Leskinen (2002) ont pu démontrer que des modifications de la composition de la matière organique pouvaient affecter la diversité des bactéries hétérotrophes, et par voie de conséquence leur influence au sein l'écosystème. Plus précisément, la variation des substrats organiques en fonction de leur origine (algues, picocyanobactéries, zooplancton, apports allochtones), et donc l'importance réactive des diverses classes de substrats organiques carbonés ont pu affecter la diversité des bactéries hétérotrophes (van Hannen *et al.* 1999, Grover & Chrzanowski 2000).

Les facteurs et interactions biologiques directes (prédation, lyse virale) comme facteurs explicatifs dans l'évolution des dynamiques microbiennes

L'analyse statistique appliquée à l'ensemble des données de suivi n'a pas permis de mettre en évidence un fort effet de régulation des communautés picoplanctoniques par les facteurs de type « top down » que représentent l'abondance des prédateurs potentiels et des virus. Une régression linéaire a été identifiée entre les virus et les bactéries hétérotrophes dans les deux lacs mésotrophes, toutefois, l'ACRp n'a pas permis d'identifier l'abondance virale comme un facteur explicatif significatif dans le déterminisme de la variabilité annuelle des bactéries hétérotrophes. A l'inverse, sur la base des résultats de la RLM visant à expliquer la variance de l'abondance virale, et également, sur la base des approches expérimentales que nous avons menées (voir chapitre V), il semble que les virus soient dépendants de la dynamique et de l'activité des bactéries hétérotrophes. Nos résultats suggèrent en effet le contrôle potentiel du métabolisme bactérien sur les virus. A l'instar des virus, les prédateurs, dans les deux lacs mésotrophes, n'apparaissent pas (suite aux analyses des données *in situ*) comme un facteur majoritaire dans l'explication de la variabilité des communautés microbiennes. Toutefois, il est clair que, en considérant uniquement l'abondance globale des communautés (bactéries hétérotrophes, flagellés, ciliés, virus), et en omettant de nombreux éléments concernant par exemple la structure des communautés (diversité génétique, morphologique et physiologique...) nos résultats n'ont qu'un caractère très partiel. Les interactions trophiques doivent sans nul doute s'envisager avec une finesse taxonomique plus précise pour décortiquer efficacement les interrelations. De plus, le fait de considérer l'ensemble des données (c'est à dire toutes périodes confondues) dans nos analyses (RLM et ACRp), ne nous a pas permis de visualiser les moments pour lesquels les relations virus-bactéries ou prédateurs-bactéries sont les plus nets. En effet des résultats récents obtenus sur le lac du Bourget ont révélé l'existence de changements rapides dans l'importance relative des prédateurs (ciliés vs. flagellés) qui exercent une régulation très forte sur les bactéries hétérotrophes (Comte *et al.* 2006). De plus lorsque, pour l'analyse des données 2002-2003, nous avons testé les relations statistiques entre log [VLP] et log[Bactéries] il apparaît clairement des différences saisonnières dans ces relations (Article II).

Synthèse sur la régulation annuelle « Top Down » et « Bottom up » des communautés microbiennes

L'analyse détaillée des données relatives aux suivis écosystémiques des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy nous a donc permis de suggérer des différences très nettes dans l'influence des facteurs de « type bottom up » et « top down » sur les bactéries hétérotrophes. Les facteurs de type « Bottom up » semblent relativement les plus importants, ce qui va dans le sens de la littérature récente (Salcher *et al.* 2007, Burns & Galbraith 2007). La place centrale des bactéries hétérotrophes dans les diagrammes de dispersion de l'ACRp suggère en effet l'importance considérable des éléments nutritifs mais également de la présence des communautés autotrophes de petite taille (picocyanobactéries et petits eucaryotes), source de matière organique pour ces bactéries. La faible significativité des impacts « top down », liée aux prédateurs potentiels et aux virus, sur les bactéries hétérotrophes, ne signifie pas que leur impact est inexistant. Il est bien connu en effet que le broutage des divers prédateurs est largement variable dans le temps avec ponctuellement de forts impacts en fonction de l'importance relative de certains groupes de prédateurs ou de bactéries (Gasol *et al.* 1994, Wieltschnig *et al.* 2001, Domaizon *et al.* non publié). Par ailleurs il est important de ne pas oublier le rôle éventuel du metazooplancton que nous n'avons pas considéré et qui peut représenter un acteur clé dans les phénomènes de prédation s'exerçant sur le pico- et le nanoplancton (Jurgens 1994, Thouvenot *et al.* 1999, Comte *et al.* 2006). Cette variabilité d'impact au cours du temps est également vraie pour les virus d'après les travaux de Suttle (1994), Weinbauer & Peduzzi (1995), Steward *et al.* (1996), Guixa-Boirereu *et al.* (1999), Wommack & Colwell, (2000), SimeNgando *et al.* (2003), Bettarel *et al.* (2003), Pradeep Ram *et al.* (2005) ou les nôtres. A partir de ces résultats, il nous a semblé particulièrement intéressant d'utiliser, en complément de l'approche écosystémique, des approches expérimentales pour appréhender plus finement les relations proies/prédateurs et hôtes/parasites et quantifier ces relations de manière directe par la mesure de la prédation et de la lyse virale à différentes périodes ciblées de l'année (voir chapitre V).

En résumé, les résultats des suivis pluriannuels ont mis en évidence des interactions directes et indirectes entre les différents acteurs de la communauté microbienne que nous avons considérés, soulignant la complexité du déterminisme de la variabilité de la dynamique des micro-organismes. Il est évident qu'une compréhension plus approfondie de cette variabilité devrait s'accompagner de la mesure du métabolisme des organismes (production bactérienne et primaire, mesure d'activité enzymatiques, etc), de leur diversité et enfin de la mesure de la qualité et de la quantité de matière organique présente afin de pouvoir établir le plus efficacement possible les interrelations microbiennes, leurs rôles directes ou indirects sur la composition du milieu et inversement.

CHAPITRE V

**Impacts des virus sur les bactéries hétérotrophes et les
picocyanobactéries appréhendés au moyen d'expériences
*in situ***

CHAPITRE V : Impacts des virus sur les bactéries hétérotrophes et les picocyanobactéries appréhendés au moyen d'expériences *in situ*

V.1 Approches par la méthode de dilution

Estimation de la mortalité des communautés picoplanctoniques

V.1.a Contexte et Objectifs

Comme cela a été décrit précédemment (chapitre I.5.b), les virus et les protistes hétérotrophes sont parmi les agents les plus significatifs pour rendre compte de la mortalité des organismes microbiens dans tous les écosystèmes aquatiques. Différentes études ont mis en évidence que les virus pouvaient expliquer jusqu'à 70% de la mortalité des cyanobactéries en milieu marin (Proctor & Fuhrman 1990) et jusqu'à 90-100% de la mortalité des bactéries hétérotrophes dans des écosystèmes d'eau douce (Weinbauer & Hofle 1998, Fischer & Velimirov 2002). Il ne fait donc plus aucun doute aujourd'hui que les virus puissent représenter une source de mortalité considérable pour les organismes planctoniques, comparable à l'impact exercé par les prédateurs planctoniques plus classiques que sont les flagellés hétérotrophes (Fuhrman 1999, Wommack & Colwell 2000, Weinbauer 2004, Brussard 2004, Suttle 2005). Il est supposé toutefois que l'effet de ces deux causes de mortalité sur le réseau trophique ne soit pas le même puisque le broutage exercé par les prédateurs va permettre plus particulièrement le transfert des nutriments vers les niveaux trophiques supérieurs (Wetzel 2001) alors que la lyse virale permettrait surtout le recyclage des nutriments au sein de la boucle microbienne (Middelboe *et al.* 1996, Wilhelm & Suttle 2000, Middelboe & Lyck 2002). Il est donc important de pouvoir déterminer et mesurer simultanément la lyse virale et le broutage des prédateurs sur les communautés microbiennes afin d'obtenir une meilleure compréhension des facteurs dirigeant les flux de matière dans les réseaux trophiques aquatiques.

Ainsi, en complément de l'approche écosystémique menée sur les trois lacs péri-alpins, il est apparu important de tenter d'appréhender l'impact des flagellés hétérotrophes et des virus sur la mortalité des bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries par des approches expérimentales afin d'explorer certaines hypothèses émises à l'issue de l'approche *in situ*. Ces approches expérimentales visaient par exemple à vérifier que, derrière le relativement faible impact structurant de la prédation et des virus pour l'abondance bactérienne à l'échelle annuelle ou pluriannuelle, des estimations effectuées à des périodes ciblées pouvaient mettre en évidence de larges variations dans l'effet régulateur des ces facteurs « Top Down ».

L'objectif des 3 études présentées ci-après a été de mesurer conjointement la mortalité des procaryotes (bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries) engendrée par la lyse virale et pour la prédation des flagellés hétérotrophes. Elles ont été conduites dans les 3 lacs péri-alpins à différentes périodes de l'année, afin de mesurer les impacts de lyse et de prédation et d'observer l'existence d'une variabilité ou d'une relative stabilité de ces processus. Au total, 19 expériences de dilution ont été réalisées, trois en 2003 (Exp. A) dans le lac du Bourget, deux en 2004 dans le Léman (Exp. B) et enfin 14 en 2005 et 2006 dans les trois lacs (Exp. C).

V.1.b Principaux résultats obtenus

Les résultats majeurs de l'ensemble de ces expériences ont été :

- que la modification de la technique de dilution semble applicable à la mesure de la mortalité bactérienne imputable aux virus et/ou prédateurs flagellés ;
- qu'il existe une forte variabilité saisonnière de l'impact des virus et des prédateurs sur la communauté bactérienne et picocyanobactérienne ;
- que de fortes valeurs de prédation et de lyse virale de la communauté des bactéries hétérotrophes peuvent être mesurées à la fin du printemps, en été et en automne dans les lacs Léman et du Bourget mais pas dans le lac d'Annecy ou les périodes hivernales en général ;
- que l'impact de la lyse virale et de la prédation a pu être uniquement mesuré en été dans les trois lacs et en automne dans les deux lacs mésotrophes en ce qui concerne les picocyanobactéries ;
- que la lyse virale pourrait avoir un effet indirect (via la redistribution de nutriments par exemple) favorisant la croissance des différentes communautés.

V.1.c ARTICLES III, IV, V

Les pages qui suivent reprennent trois manuscrits retraçant les expériences de dilution qui ont été conduites dans les trois lacs péri-alpins. Le premier article (Jacquet *et al.* 2005) présente l'expérience de dilution (Exp.A), modifiée et appliquée pour la première fois aux bactéries hétérotrophes, et réalisée dans le lac du Bourget en 2003. Le second article (Duhamel *et al.* 2006) rapporte les résultats d'expériences (Exp.B) menées dans le Léman au printemps 2004. Le troisième article (Personnic *et al.* soumis) est le lieu d'une série d'expériences (Exp.C) de dilution réalisée dans les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy entre 2005 et 2006.

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

Freshwater Biology (2005) 50, 627-645

Stéphan JACQUET^{1*}, Isabelle DOMAIZON², Sébastien PERSONNIC¹, Angia Sriram
PRADEEP RAM³, Mikal HEDAL⁴, Solange DUHAMEL¹, Télesphore SIME-NGANDO³

- 1 *UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie
Lacustre, 74203 Thonon cedex, France*
- 2 *UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Université de Savoie, 73376 Le
Bourget-du-Lac cedex, France*
- 3 *Laboratoire de Biologie des Protistes, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand 2),
Campus des Cézeaux, 63 177 Aubière cedex, France*
- 4 *Laboratory of Microbiology, University of Bergen, Jahnebakken 5, 5020 Bergen,
Norway*

To whom correspondence should be addressed

jacquet@thonon.inra.fr ; Tel: +33.4.50.26.78.12 ; Fax : +33.4.50.26.07.60

Keywords: Lake, viruses, bacteria, protists, mortality

Running head: Bacterial mortality in Lake Bourget

Summary

1. 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).
2. 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.
3. 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.
4. 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).
5. 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.

Introduction

Over the past 15 years, it has been realised how viruses are an important biological compartment in aquatic microbial food webs. They have been shown to be important controlling agents in planktonic community composition, diversity and succession, playing a key role in cell mortality and nutrient cycles (Bergh *et al.*, 1989; Suttle, 1994; Maranger & Bird, 1995; Fuhrman, 1999; Wommack & Colwell, 2000; Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Of additional ecological significance, the ability of aquatic viruses to transfer genetic material has been demonstrated (Chiura, 1997; Clokie *et al.*, 2003). A large majority of aquatic viral ecological studies have been carried out in seawater (see Wommack & Colwell, 2000; Sime-Ngando *et al.*, 2003; Weinbauer, 2004). Some freshwater systems have also been investigated, although less often, and these include rivers (Mathias *et al.*, 1995; Farnell-Jackson & Ward, 2003), Antarctic lakes (Kepner *et al.*, 1998; Laybourn-Parry *et al.*, 2001), oligotrophic lakes (Klut & Stockner, 1990; Tapper & Hicks, 1998; Hoffer & Sommaruga, 2001; Bettarel *et al.*, 2003b; Vrede *et al.*, 2003; Bettarel *et al.*, 2004), mesotrophic lakes (Hennes & Simon, 1995; Maranger & Bird, 1995; Leff *et al.*, 1999; Wilhelm & Smith, 2000), and eutrophic lakes (Sommaruga *et al.*, 1995; Weinbauer & Höfle, 1998; Fischer & Velmirov, 2002; Bettarel *et al.*, 2003a; Weinbauer *et al.*, 2003; Bettarel *et al.*, 2004) as well as lake sediments (Maranger & Bird, 1996). In France, the three largest natural freshwater ecosystems (Lakes Annecy, Bourget, and Geneva) have not yet been investigated from this angle and, to the best of our knowledge, only the oligotrophic Lake Pavin and the eutrophic Lake Aydat and Sep Reservoir have received recent interest in France (Bettarel *et al.*, 2003a, 2003b, 2004).

We used a variation of the dilution technique to assess the virus-induced mortality of heterotrophic bacteria in Lake Bourget. The dilution approach initially introduced by Landry & Hassett (1982) and refined by Landry *et al.* (1995) has been routinely used as a field technique to quantify grazing of phytoplankton by micro-zooplankton and to estimate phytoplankton growth rate (Campbell & Carpenter, 1986; Weisse & Scheffell-Möser, 1990; Landry *et al.*, 1993; Calbet & Landry, 2004). Briefly, the technique consists of incubations of water samples after dilution at different levels of the original sample to reduce the abundance of algal and/or bacterial predators and thus to make contact and interactions between predator and prey species less likely to occur. The net growth rate of the prey can therefore be expected to be highest in the most diluted fractions. *In fine*, the method allows an estimate of the grazing impact of zooplankton. To the best of our knowledge, this technique has only been used to study the impact of viruses on micro-organisms a couple of times, for both heterotrophic and autotrophic groups. Wilhelm *et al.* (2002) studied the rebound in virus numbers following dilution in free-virus water. Evans *et al.* (2003) estimated the virus-induced mortality of a coastal and marine phytoplankton.

The objective of this study was to assess the impact of viruses on the heterotrophic bacterial communities at different periods of the year in Lake Bourget and then to compare these findings with those obtained in various other European lakes. Parallel grazing experiments were also performed in order to estimate the potential impact of the protozoan predators on the bacterial community to permit a comparison between viral lysis induced bacterial mortality and protozoan predation on bacteria. The grazing data were also compared with those from various other European freshwater ecosystems.

Materials and methods

Study site

Lake Bourget (45°44'N, 05°51'W, 231 m altitude) is the largest natural French lake, and is located in the eastern part of France, on the edge of the Alps. It is a warm and meromictic lake. It is an elongated (18 and 3 km in length and width respectively) and north-south orientated lake, with an area of $42 \times 10^6 \text{ m}^2$, a total volume of $3.5 \times 10^9 \text{ m}^3$, maximum and average depths of 145 m and 80 m respectively, and a water residence time of approximately 10 years. It has a catchment's area of about 560 km^2 , with maximum and average altitudes of 1,845 and 700 m respectively. More details (including a map of the lake) are available in Jacquet *et al.* (in press).

Assessment of the in situ microbial communities' dynamics

In situ dynamics of the microbial communities (*i.e.* viruses, heterotrophic bacteria and picocyanobacteria) were assessed using flow cytometry (FCM) for the reference station of the lake, known as B, which is located in the middle and deepest part of the northern basin. This station is more than 1.5 km from each bank and more than 5 and 10 km from the Sierroz and Laysse rivers (the two main freshwater inputs in the lake) respectively. Cell or particle concentrations for the different communities were measured at 7 different depths between 0 and 50 m (2, 6, 10, 15, 20, 30, and 50 m) and sampled on average every two weeks between March and September 2003. In addition, the change in water temperature, transparency, and nitrate and phosphate concentrations were also assessed over the same time scale as above (see below).

Environmental variables

A conductivity-temperature-depth measuring device (CTD SBE 19 Seacat profiler, SEABIRD) was used to obtain vertical profiles (from the surface to the bottom) of the water temperature, and to make sure that in all 3 experiments we always sampled in the mixed surface layer and never below the epilimnion (see below). Nutrient concentrations (total Phosphorus, P-PO₄, N-NO₃, N-NH₄ and Si-SiO₂) were measured at the INRA Hydrobiological Station chemistry laboratory (details available at <http://www.thonon-inra-chimie.net/pages/public/analyses.asp>). Water transparency was measured using a Secchi disk, before and after the experiments, during routine surveys of the lake, and all these measurements were performed by the same person. The underwater light intensity was measured using a LI-1400 current meter and data logger combined with a spherical quantum sensor LI-193SA (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

Experimental set-up for estimating the impact of viruses on bacteria

Three similar experiments were conducted in March-April (31-4 referred later to as Exp1), May (19-23: Exp2) and August (18-22: Exp3), which corresponded to distinct periods in terms of the microbial planktonic dynamics and diversity in surface waters of the lake (Comte *et al.*, in press; Dorigo *et al.*, submitted; Jacquet *et al.*, in press). For each period, an integrated >60-L sample was taken in the 0-10 m surface layer of the second reference station (called A) located in the middle and deepest part (100 m) of the southern basin of the lake, located at a distance greater than 1 km from each bank and 6 km from B. The decision to use water of station A rather than B was mainly on the grounds of convenience, since the former was nearer than B, where the incubations were carried out, but also because we demonstrated in a previous study that communities and dynamics were similar between stations A and B (Comte *et al.*, in revision). The water sample was first filtered through a series of 200- and 20- μm mesh filters (NYCOM, Buisine, France) and then through a 2- μm filter (Nuclepore, Whatman) twice in order to theoretically eliminate all the bacterivores (*i.e.* nanoflagellates and ciliates). Bearing in mind that some flagellates may not have been entirely removed by the filtrations, phagotrophic protists were counted in < the 2 μm fraction using a Nikon TE

200 epifluorescence microscopy (EFM). A fraction of this 2 μm -filtered water was subjected to tangential ultra-filtration using a mini-Ultrasette with a 100 Kda cut-off membrane (Vivaflow, Vivasciences) in order to eliminate all biological entities (including viruses). The purity of the water was checked using both EFM and FCM (not shown). The two fractions were mixed in order to obtain fractions of the initial 2- μm filtered whole water of ca 20, 40, 70 and 100% (also referred to as the control for the latter). Our dilution technique allowed us to reduce the background of free viruses by adding virus-free water, thus reducing the amount of contact between viruses and bacteria as a result of changes in the abundance of viruses and hosts. A control bottle containing 0% of the original 2 μm -filtered water was also prepared for each experiment in order to confirm the absence of plankton contamination from the surrounding environment throughout the experiments (not shown). For each level of dilution, duplicates were prepared in acid-washed, water rinsed and autoclaved 250 ml polycarbonate bottles (Nalgene, Bioblock). Immediately after being prepared, the bottles were attached to the side of a bridge in the eastern part of the lake and then incubated at a depth of 1 m, for 5 days. Population dynamics were monitored during the whole week but the time of incubation for assessing the viral impact was limited to the first 24 h, assuming that there were no nutrient limitation and/or confinement effects during the first day of incubation. All bottles were sampled daily, early in the morning and samples were subsequently prepared for FCM analysis.

FCM sample analysis

We used a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488 nm with the standard filter set-up. One ml samples were analyzed without adding any fixative or dye to analyse the picocyanobacterial community dynamics and also to check for the absence/presence of autotrophic organism in the <2 μm treated samples. Fluorescent microbeads (Molecular Probes Inc.) of 1 μm in diameter were added to each sample as an internal standard. Another 1-ml sample was fixed with 0.25% glutaraldehyde (final concentration, Sigma) and used for bacterial and viral counts via FCM. Briefly, for heterotrophic bacteria, samples were diluted with 0.2 μm -filtered water from the lake while for viruses, samples were diluted with 0.02 μm -filtered TE (Tris-EDTA, pH=8) buffer, and then heated for 10 minutes at 75°C. Samples were stained with SYBR Green I (1/10,000 final dilution of stock supplied by manufacturer) for 15 minutes in the dark. We found this protocol was the most accurate and the results will be published elsewhere (Dorigo *et al.*, submitted; some details can also be found in Marie *et al.*, 1999). Cytotiles were analyzed using Cytowin (Vaulot, 1989).

TEM sample analysis

Samples were also taken in the <2 μm filtered sample at time zero and fixed in formalin (5% final concentration) for the analysis of infected cells by TEM. For analysis, the samples were kept at 4°C for one week before being mailed to T. Sime-Ngando. In the formalin-fixed samples, the bacteria contained in 8-ml subsamples were harvested by ultracentrifugation onto 400 mesh NI electron microscope grids with carbon-coated Formvar film, by using a Centrikon TST 41.14 Swing-Out-Rotor run at 70,000 x g for 20 min at 4°C (Weinbauer & Peduzzi, 1994; Sime-Ngando *et al.*, 1996). Each grid was then stained for 30 s with uranyl acetate (2% wt/wt) and examined using a JEOL 1200EX TEM operated at 80 kV at a magnification of x 40,000. A cell was considered to be infected when the phages inside could be clearly recognized on the basis of shape and size. At least 600 bacterial cells were inspected per sample for a target number range of infected cells of 20-25 per sample. The minimal number of phages found in an infected cell was five. To estimate the virus-induced bacterial mortality (VIBM), the frequency of visibly infected cells (FVIC, as a percentage)

was first related to the frequency of infected cells (FIC) as follows: $FIC = 9.524 FVIC - 3.256$ (Weinbauer *et al.*, 2002). The FIC was then converted to the VIBM according to Binder (1999): $VIBM = (FIC + 0.6 FIC^2)/(1 - 1.2 FIC)$. In a steady-state system, the bacterial mortality due to viral lysis matches the bacterial production which is removed by lysis (Suttle 1994). Thus, multiplying the lysed bacterial production by the burst size (*i.e.* the number of viruses produced per cell) yields the viral production (Weinbauer & Höfle, 1998).

Assessment of flagellate grazing

In addition to the dilution experiments, grazing measurements were made both in the $<2\mu\text{m}$ fraction and in the original untreated water sample, in order to assess the potential impact of bacterivores which could have passed in the $<2\mu\text{m}$ fraction, and the total impact of bacterivores in the original water sample. Briefly, experiments were conducted in duplicate in 250 ml glass containers in which $0.5\text{-}\mu\text{m}$ tracer particles (Fluoresbrite Plain Microspheres, Polysciences Inc.) were added ($0.5\mu\text{m}$ represented a particle size close to the mean length of heterotrophic bacteria in Lake Bourget, Comte *et al.*, in press). After a few minutes to allow the plankton to acclimatize to the glass bottles, the beads were injected (micro-spheres final concentration = 5 to 20 % of bacterial concentration in the lake). Beads concentration was estimated by EFM after filtration onto $0.2\mu\text{m}$ pore size polycarbonate black filters (Millipore). Based on preliminary measurements of predation kinetics in pre-alpine lakes (Domaizon *et al.*, 2003; Domaizon, unpublished), we chose an incubation time of 15 minutes. For the three experimental series, we conducted the grazing measurements *in situ*, in 2 experimental bottles in which we took and analyzed samples at $t=0$ min and 15 min. Ice cold glutaraldehyde was added to each sample (2 % final concentration) for minimizing the egestion of particles (Sander *et al.*, 1989), and the micro-beads ingested by flagellates were counted after filtering each sample (30 ml) onto a $0.8\mu\text{m}$ polycarbonate black membranes (Nucleopore) and staining by Primulin according to the protocol described by Caron (1983, $200\mu\text{g}$ primulin per ml of distilled water with 0.1 mol L^{-1} Tris-HCl). Flagellates and micro-beads were observed at a $1,250\times$ magnification under UV and blue light. Briefly, UV light allowed displaying microbeads and all flagellates which were primulin-stained. On the same microscopic field, pigmented flagellates were distinguished by switching on blue light (500nm) to observe the auto-fluorescence of chlorophyll *a*. Taxa which had plastids and ingested microbeads were considered as mixotrophs. In order to compare flagellates grazing to daily viral lysis (expressed as the % of bacterial standing stock removed daily), we converted flagellates grazing to a number of bacteria potentially consumed by flagellates during 24 h which allowed us to evaluate the % of bacterial standing stock consumed daily by flagellates.

The clearance rate ($\text{nl flagellate}^{-1}\text{ h}^{-1}$) was calculated for each taxon by dividing the number of beads ingested per hour by the concentration of beads in the bottle. The ingestion rate of each taxon ($\text{bacteria flagellate}^{-1}\text{ h}^{-1}$) was calculated by multiplying the corresponding clearance rate by the concentration of heterotrophic bacteria. The grazing impact ($\text{bacteria h}^{-1}\text{ L}^{-1}$) of a taxon was estimated by multiplying its ingestion rate by its concentration.

Missing data

Because of FCM problems, no data were available for either the picocyno- or the heterotrophic bacterial communities for the last experiment after day 3. No virus data were available for the last experiment for the same reason.

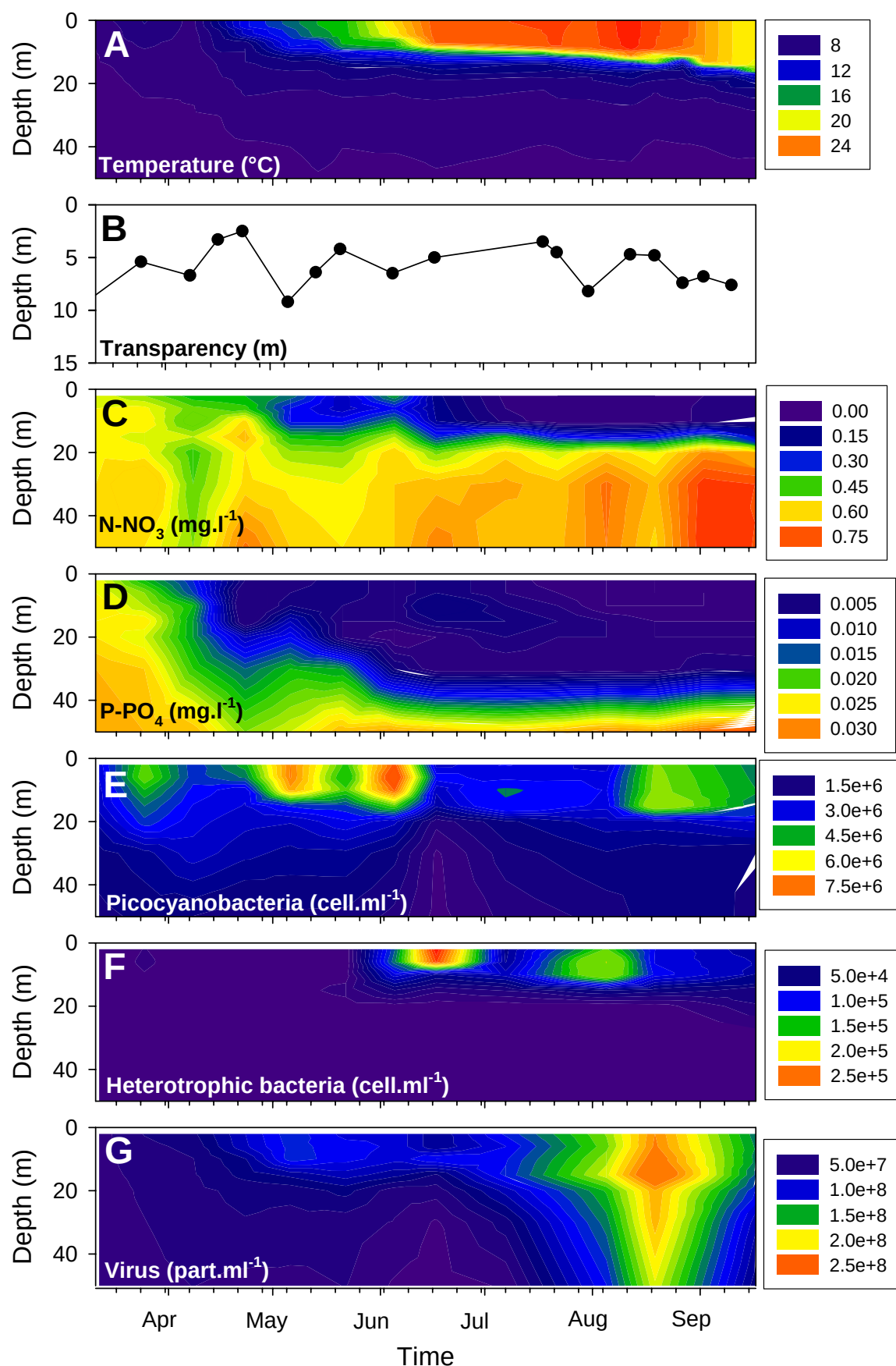


Figure 1: Data sets for water temperature (A), water transparency (B), N-NO₃ (C), P-PO₄ (D), picocyanobacteria abundance (E), heterotrophic bacteria abundance (F) and viruses abundance (G) over 0-50 m between March and September 2003.

Results

Environmental conditions

Between the end of March and the end of August, the water temperature just under the surface of Lake Bourget increased from 7.5°C (Exp1) to 16.3°C (Exp2) and then to 24.8°C (Exp3). The onset of water stratification was recorded from the end of winter, and it lasted until early fall (Figure 1A). No significant differences were recorded between the temperatures at a depth of 1 m at the two sampling stations (both A and B) and the place where the bottles were incubated near the shore (not shown). The water transparency changed from 5.4 to 6.7 m between 25 March and 8 April, from 6.4 to 4.2 m between 14 and 21 May, and was equal to 4.8 m on 19 August (Figure 1B). The nutrient concentrations (P-PO₄, total P, N-NO₃, N-NH₄, and SiO₂) measured at the beginning of each experiment are summarised in Table 1. In summary, both total phosphorus and phosphate concentrations decreased from the first to the third experiment in near surface waters whereas the ratio of nitrates to phosphates increased dramatically suggesting a definite increase in P limitation over the year (see also Figure 1C-D). The concentrations of the other elements remained relatively high (Table 1).

Table 1: Nutrient concentrations measured at the beginning of the 3 experiments. Concentrations are given in µg L⁻¹.

	Exp1	Exp2	Exp3
	31 March	19 May	18 August
Total P	24	19	10
P-PO₄	7	5	1
N-NO₃	140	240	100
N-NH₄	13	54	46
Si-SiO₂	820	640	1003
N-NO₃/P-PO₄	20	48	100

Development of the microbial communities

In-situ dynamics in the middle of the lake (station B)

From March to September, different patterns could be observed for the microbial communities analyzed by FCM with a succession over time of the different groups. The highest concentrations were always recorded in the top 10-15 m layer, first for the picocyanobacteria, then the heterotrophic bacteria and finally the viruses. Counts of 2.8×10^5 cell ml⁻¹ for the picocyanobacteria (Figure 1E) and 8.3×10^6 cell ml⁻¹ for the heterotrophic bacteria (Figure 1F) were obtained in early and late June respectively, and of 2.6×10^8 part.ml⁻¹ for the viral community (Figure 1G) in mid-August. No significant correlation was observed between the heterotrophic bacteria and the picocyanobacteria or between the picocyanobacteria and the viruses on the basis of FCM counts. However, there was a relatively close linear regression between heterotrophic bacteria and viruses ($r=0.4$, $n=70$,

$p < 0.01$). As we could see that viral development regularly lagged behind that of its potential hosts or was recorded virtually simultaneously but at a different depth (especially in summer), this could probably account for the lack of a really close and clear positive correlation with a $r > 0.4$. It was more difficult to explain why there was a relatively high concentration of viruses throughout the water column (0-50m) in August that was not related to levels of the other groups mentioned above. This pattern could not be related to any analytical problems, which suggests that it could be linked to other planktonic groups, such as heterotrophic pico- or nanoplankters (*e.g.* Vaultot *et al.*, 2002) or to the adsorption of viruses to small sedimenting particles. It has previously been shown that this last possibility may make a contribution to high sediment abundances (Danovaro *et al.*, 2001).

Temporal changes in viral and bacterial abundances in experiments

The lowest abundances of heterotrophic bacteria were found during the first experiment, with an average of 6.2×10^6 cells ml^{-1} over the incubation period (Figure 2A). These values increased as the year progressed to 6.9×10^6 cells ml^{-1} for Exp2 and to 1.2×10^7 cells ml^{-1} for Exp3. The dynamics of this community were very different in each experiment, with a regular increase in the cell number during Exp1, a bell shape in Exp2 and a very considerable increase in Exp3. The net growth rate estimated during the first 24-h was 0.23 d^{-1} (Exp1), 0.72 d^{-1} (Exp2) and 1.15 d^{-1} (Exp3). It is noteworthy that the initial concentration of the heterotrophic bacteria was relatively similar whatever the season, ranging from 3.2 to 4.3×10^6 cell ml^{-1} .

The initial concentrations of the viral community (Figure 2B) and of the VBR (*i.e.* the ratio between viruses and heterotrophic bacteria, Figure 2C) were significantly different in Exp1 (with 6.2×10^7 part ml^{-1} and a VBR of 19) and Exp2 (with 8.9×10^7 part ml^{-1} and a VBR of 27). Mean concentrations of the viruses and the VBR throughout the incubation period were about 6.7×10^7 part ml^{-1} and 12 (Exp1) and 8.6×10^7 part ml^{-1} and 14 (Exp2) respectively. However, the concentrations of viruses varied quite a lot, with a reverse pattern in the two experiments (Figure 2B). In contrast, VBR patterns were relatively similar between the two experiments and a clear decrease was recorded along the five days of incubation (Figure 2C).

Table 2: Comparison between the specific gross growth rate of heterotrophic bacteria given by the regression lines in Fig. 4 and the specific gross growth rate calculated from the net growth rate observed in Fig. 2 and the mortality coefficient from the regression lines in Fig. 4.

	Net growth rate (d^{-1})	Viral- mediated mortality rate (d^{-1})	Calculated gross growth rate (d^{-1})	Estimated gross growth rate (d^{-1})
Exp1	0.23	0.29	0.52	0.48
Exp2	0.72	0.36	1.08	1.04
Exp3	1.15	1.14	2.29	2.2

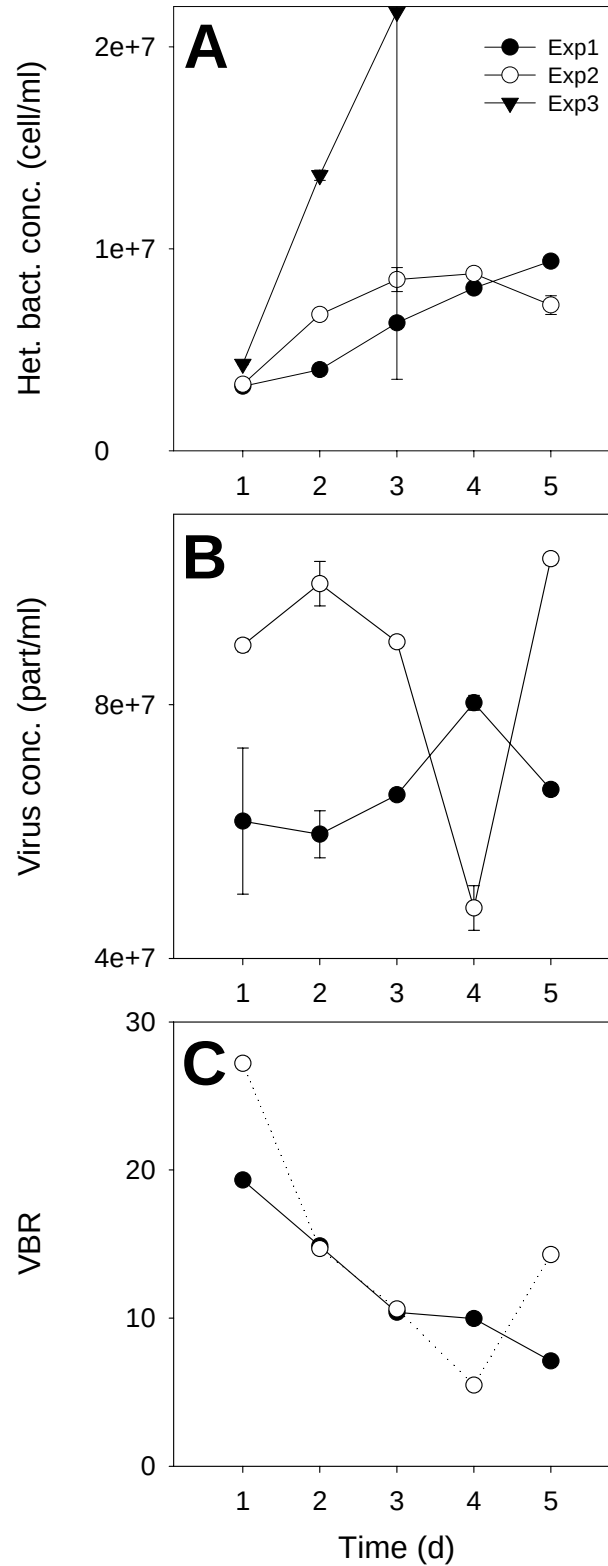


Figure 2: Time series obtained over 3 to 5 days for the heterotrophic bacterial (A) and viral (B) communities and of the VBR (viruses-to-bacteria ratio) in the control (undiluted) bottle of the different dilution experiments.

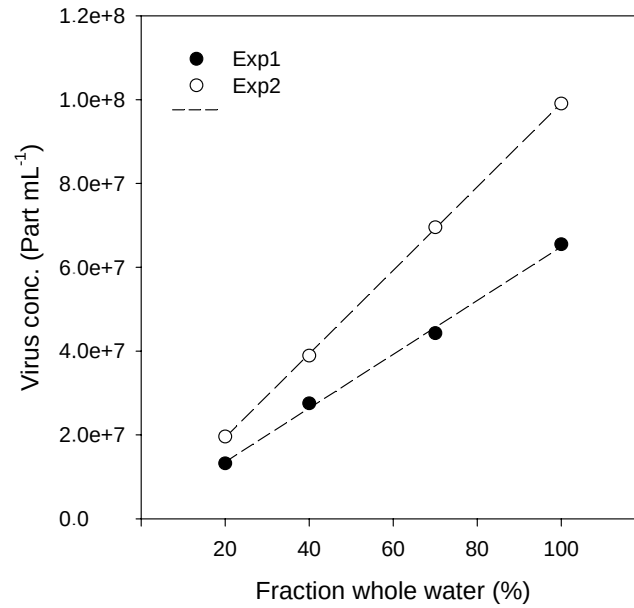


Figure 3: Virus concentration against the fraction of whole water for Exp1 and 2 dilution series.

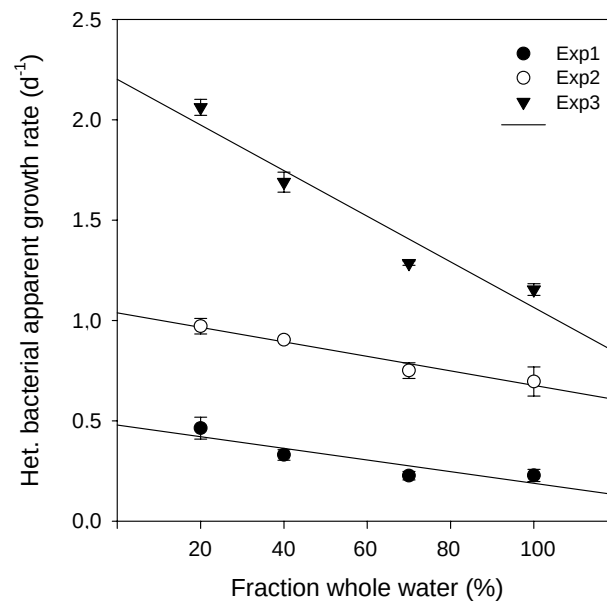


Figure 4: Dilution plots and analysis when virus and grazer-free water was used to dilute the $<2 \mu\text{m}$ filtered sample for each experiment. The equations of the different plots are as follows for the heterotrophic bacteria: Exp1: $y = 0.4791 - 0.2889x$ ($r^2 = 0.93$); Exp2: $y = 1.0385 - 0.3617x$ ($r^2 = 0.98$) and Exp3: $y = 2.2012 - 1.1366x$ ($r^2 = 0.99$).

Bacterial growth and mortalities in dilution experiments

The FCM analysis revealed clearly that the ultrafiltrate used to dilute the natural sample was devoid of any particles, including viruses. This means that there was a clear gradient in the virus concentration over the series of dilutions (Figure 3). In the 3 dilution experiments conducted on March-April (Exp1), May (Exp2) and August (Exp3), significant

relationships were found between the level of dilution and the apparent growth rate of the heterotrophic bacterial community (Figure 4). The regression analysis of dilution plots allowed us to estimate both the specific growth and mortality rates in the incubation bottles as being 0.48 and -0.29 d⁻¹ for Exp1, 1.04 and -0.36 d⁻¹ for Exp2, and 2.2 and -1.14 d⁻¹ for Exp3, respectively. We verified that these values were in agreement with the net growth rate mentioned above (Table 2). Thus, the impact of viruses was calculated to be equivalent, at first sight, to daily bacterial removal rates of 60.3%, 34.6% and 51.8% respectively.

TEM analysis

From the TEM analysis, we estimated 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), and the virus-induced bacterial mortality was 6.3% (Exp1), 3.7% (Exp2) and 6.3% (Exp3). These last values that can be assigned to the daily loss of percentage of bacterial production due to viral lysis revealed obvious differences from the results obtained following the method based on dilution-FCM. Electron micrographs (Figure 5) allowed us to observe that the viruses of Lake Bourget, both inside and outside bacterial cells, presented different size and morphologies (tailed or not). Most of the particles had a size <70 nm in diameter. This viral diversity was not surprising when we consider that the bacterial diversity in Lake Bourget is probably very high and changes with the seasons (Comte *et al.*, in press; Dorigo *et al.*, submitted), not to mention the genetic diversity of the viruses themselves (Dorigo *et al.*, 2004; Jacquet, unpublished).

Protozoan grazing of bacteria and assessment of viral lysis vs. predation pressure

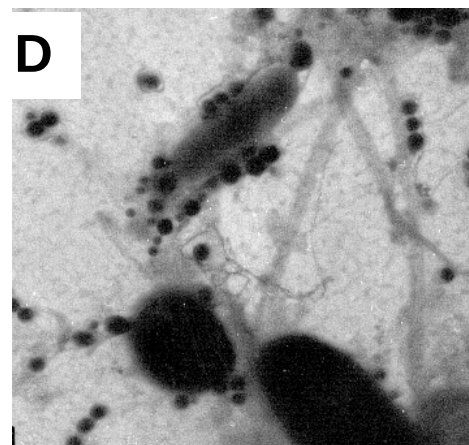
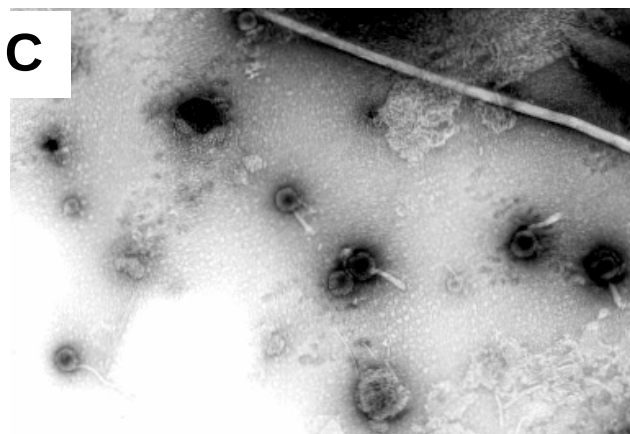
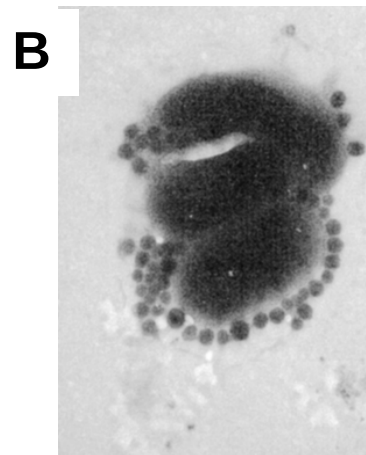
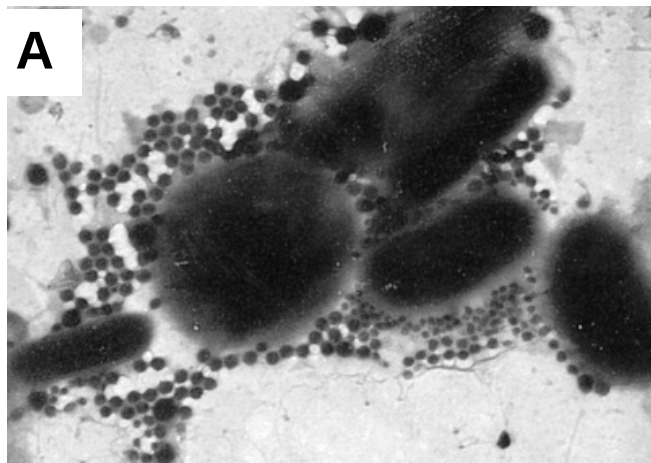
Some small flagellates slipped throughout the smallest filtration cut-offs, due to their amoeba-like or oval-shaped. The initial abundances of heterotrophic and mixotrophic flagellates in untreated water were 3x10³ cell ml⁻¹ (Exp1), 2.9x10³ cell ml⁻¹ (Exp2), 1.7x10³ cell ml⁻¹ (Exp3) and 1.2x10⁴ cell ml⁻¹ (Exp1), 1.1x10⁴ cell ml⁻¹ (Exp2), 3.4x10⁴ cell ml⁻¹ (Exp3) respectively. The "contamination" rate in the <2 µm-filtered water largely varied according to taxon. The potentially mixotrophic flagellates (mainly some *Cryptomonas* and *Dinobryon* spp.) were usually mainly eliminated by filtration, since only 0.6% (Exp1), 6% (Exp2) and 10% (Exp3) of their initial abundances were observed in the <2 µm fraction. Flagellates which slipped through the filtering process consisted mainly of small heterotrophic flagellates, and their abundance was reduced to 18% (Exp1), 11% (Exp2) and 35% (Exp3) of the initial concentration found in the untreated water. Among these small heterotrophic flagellates, we observed picoflagellates (2-3 µm) such as unflagellated cells (not identified), chrysomonads such as *Spumella* (3-4 µm) and cryptomonad forms such as *Katablepharis* (7 µm).

Ingestion rates largely varied according to taxon, and ranged from 1 to 45 bacteria flagellate⁻¹ h⁻¹. Heterotrophic flagellates per capita ingestion rates were 2.6x10³ bacteria ml⁻¹ h⁻¹ (Exp1), 2.1x10³ bacteria ml⁻¹ h⁻¹ (Exp2), and 1.7x10⁴ bacteria ml⁻¹ h⁻¹ (Exp3). In the same water sample (<2 µm fraction), mixotrophic flagellates presented grazing rates of 5x10² bacteria ml⁻¹ h⁻¹ (Exp1), 4.3x10³ bacteria ml⁻¹ h⁻¹ (Exp2), and 2.1x10³ bacteria ml⁻¹ h⁻¹ (Exp3). In the <2 µm-filtered water, the fluorescent micro-beads technique allowed us to estimate that the flagellate grazing could induce the removal of 1.9 % (Exp1) 4.8 % (Exp2) 7.8% (Exp3) of the heterotrophic bacteria in the first 24 h of incubation. The potential impact of grazing in experimental bottles thus appeared to be rather low compared to the virus-induced mortality estimated using the dilution method.

In order to compare the impact of viral lysis to total flagellates grazing, we also assessed the grazing predation pressure in the untreated water samples. It appeared that flagellate grazing (both mixotrophs and heterotrophs) could be responsible for 56.5% (Exp1)

63.2% (Exp2) and 18.2% (Exp3) of the daily heterotrophic bacterial removal. Thus, according to our estimation, flagellate grazing had a significantly greater impact than viruses only in May. The impact of viruses and protozoa was almost the same in April whereas the impact of viruses was greater than that of protozoa in August. Indeed, with regard to the viral impact estimated by the dilution method, the ratios of mortalities due to flagellate bacterivores and to viruses were 0.95 (Exp1), 1.8 (Exp2) and 0.35 (Exp3). The impact of viral lysis estimated using the percentage of visibly infected cells led to quite different results, with higher bacterivory to viral lysis ratios, *i.e.* 9 (Exp1), 17 (Exp2) and 3 (Exp3). All results revealed an increased impact of viruses during summer.

It is noteworthy that our estimated grazing mortality considered not only heterotrophic nanoflagellates but all bacterivorous flagellates. The grazing impact of mixotrophs could exceed that of the heterotrophs, particularly during the Spring (Exp1 & 2), which was because of the relatively high ingestion rates of *Dinobryon* and large *Cryptomonas* (6 to 16.5 bact.flagellate⁻¹.h⁻¹ and 3 to 45.5 bact.flagellate⁻¹.h⁻¹ respectively). Using the micro-beads method, the bacteria removed daily due to grazing by mixotrophic and heterotrophic flagellates was estimated to be 37.3% (Exp1) 46.7% (Exp2) 3.5% (Exp3) and 19.2% (Exp1) 16.5% (Exp2) 14.7% (Exp3) respectively.



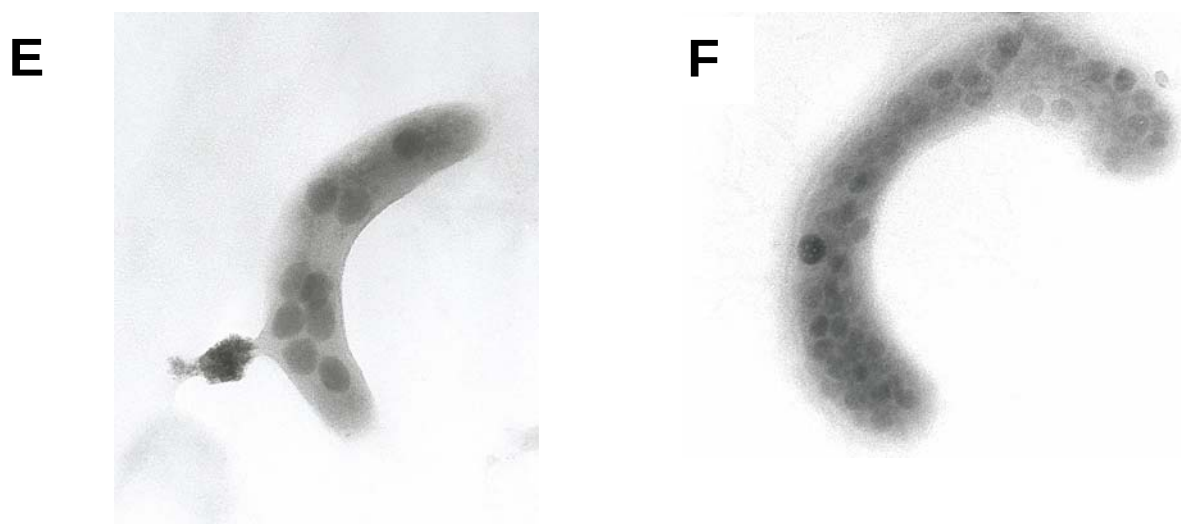


Figure 5: Transmission electronic microphotographs of free viral particles and bacteria infected with viruses from Lake Bourget. A-B: Clusters of viruses of similar size and shape surrounding rod-shaped bacteria. C: Tailed phages. D: viruses of different sizes surrounding bacteria. E-F: Phages evenly distributed inside curved-rod bacteria.

Discussion

This is the first study dealing with natural aquatic viruses of Lake Bourget, both in terms of dynamics at different periods of the year and of their potential functional role as mortality agents of bacteria. To date, there are few investigations of the seasonal fluctuations in the abundance of these particles in large natural freshwater ecosystems (Hennes & Simon, 1995; Tapper & Hicks, 1998; Hoffer & Sommaruga, 2001; Fisher & Velmirov, 2002; Bettarel *et al.*, 2003b; Vrede *et al.*, 2003; Bettarel *et al.*, 2004). Also, this study is rare in that both predation by protozoa and parasitism by viruses were investigated simultaneously (Fuhrman & Noble, 1995; Guixa-Boixareau *et al.*, 1996, 1999; Almeida *et al.*, 2001; Simek *et al.*, 2001; Bettarel *et al.*, 2003a, 2004) using a combination of methods and at different periods of the year. Although some limitations and/or drawbacks were either unavoidable or subsequently identified, our results provide a first estimation of what are the potential impacts of both the protozoan and viral communities on the bacterial community of this French great lake. It also shows how these different impacts may vary over time (Hennes & Simon, 1995; Fisher & Velmirov, 2002; Vrede *et al.*, 2003).

Microbial communities' dynamics and environmental influence

Increasing concentrations of the different communities were found as the temperature of the surface waters of Lake Bourget rose from March to September. It is suspected that temperature can be an important factor in controlling viral abundance, in that temperature controls bacterial growth rates and has a significant positive effect on bacterial production (White *et al.*, 1991; Jiang & Paul, 1994). The VBR increased gradually from winter to summer, and we did indeed find higher bacterial growth rates and biomass in summer. The first peak of heterotrophic bacteria in June was not followed by a marked increase in the viral abundance, although the bacterial biomass decreased slightly after the peak. The second peak of heterotrophic bacteria in August was clearly followed by an increase in the viral abundance and VBR could reach up to 134. As in the dilution experiment, we found that viruses could

play a key role in controlling the bacterial biomass and possibly to a greater extent than the predators. The different bacterial peaks could be related to genetically-different groups which are likely subject to different forms of parasitism and predation. Such an assumption was relatively well confirmed by the study of Comte *et al.* (in press), where we could show from FISH and microscopic analyses that there was indeed a clear seasonal variation in both the bacterial and the protozoan structures. The impact of lysis was clearly lower in May, contrasting with the predation (see below). It is possible that this feature could be related to a decrease in bacterial diversity occurring during the spring clear-water phase, as has been reported elsewhere, and which is mainly due to zooplankton grazing (Höfle *et al.*, 1999; Yannarell *et al.*, 2003). However, low diversity is likely to cause higher specific host-virus encounters and, therefore, a higher lysis rate (Thingstad & Lignell, 1997). For the picocyanobacterial community, lower values for cell concentrations were found in May than earlier in the year or thereafter. Such a finding could also be related to the clear water phase, and a major expansion in the population of cladocerans that can graze very efficiently these small phytoplankters (Jürgens, 1994; Degans *et al.*, 2002; Domaizon *et al.*, 2003; Comte *et al.*, in press). The bloom of the heterotrophic bacteria in June occurred after that of the picocyanobacteria, suggesting that the heterotrophic bacteria could use material resulting from the decline of the picocyanobacteria. Nutrients did not seem to play a critical role compared to that of the temperature at the end of winter-early spring, since the lowest concentrations of the communities were recorded at that time. In contrast, low concentrations during the summer season could suggest that they play a key role in terms of growth limitation.

As previously reported when using FCM for counting viruses, it is reasonable to assume that most of the viruses were bacteriophages (Marie *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2004). The correlation we found between heterotrophic bacteria and viruses agreed with this assumption. Moreover, the numbers we recorded are comparable to the bacteriophage abundance generally reported for both marine and freshwater ecosystems (*e.g.* Wommack & Colwell, 2000; Sime-Ngando *et al.*, 2003). The viral community was found to increase considerably either at the same time or shortly after the bacterial blooms in August. These coinciding peaks of bacteria and viruses support the idea that bacteriophages cause bacterial lysis and thus lead to changes in bacterial abundance that result in a short circuit of bacterial production (Wilhelm & Suttle, 1999). Assuming that the majority of viruses were bacteriophages, we used the FCM numbers to calculate the VBR ratios. The numbers ranged from 9 to 134 (mean=30, n=84). Such ratios fall generally between 3 and 10 but can be high for nutrient-rich productive areas (Wommack & Colwell, 2000; Almeida *et al.*, 2001; Vrede *et al.*, 2003). VBR values of <10 are thought to indicate low levels of viral-mediated bacterial mortality, whereas ratios >10 correspond to conditions that favour bacterial lysis (Wilcox & Fuhrman, 1994). The ratios observed in our material may thus be interpreted to indicate that the bacteriophages accounted for an important part of the bacterial mortality. This was confirmed by the dilution experiments.

According to TEM observations, a high proportion of the viruses displayed a size range between 50 and 70 nm in agreement with previous studies in freshwater ecosystems and suggested that these viruses were mainly bacteriophages. For example, Hennes & Simon (1995) reported a predominance of 30-60 nm viruses within the bacterioplankton. We did not observe large viruses that can be relatively common in freshwater ecosystems (Sommaruga *et al.*, 1995; Kepner *et al.*, 1998; Pina *et al.*, 1998). The production of bacteriophages (as well as the frequencies of cells containing the mature phase, the burst size, the phage head sizes and the distribution patterns of phages inside cell) is strongly influenced by the structure of the bacterial community, *i.e.* by the relative abundances of the various morphotypes (Weinbauer & Peduzzi, 1994). These differences may also be due to various physiological differences that may or may not be associated with the morphotypes. We showed in a previous study that the

bacterial structure changed considerably during the same period of the year as that covered by this study (Comte *et al.*, in press). Lysogeny and host diversity may explain the differences in the frequency of infected cells observed during the experiments. Our results confirm previous studies showing that the impact of phages may vary strongly on both the spatial and temporal scales in response to host diversity and/or changes in host physiology (Weinbauer & Peduzzi, 1994).

Methods and limitations/drawbacks

Sampling strategy

We decided always to sample in the epilimnion of the lake at the different periods of the year investigated in order to compare the same type of water structure. We are well aware that a main drawback of this strategy, adopted for logistical reasons, was that we selected only a small portion of the water column since Lake Bourget reaches a depth of 145 m. It is thus likely that we only obtained a partial picture, and that future investigations will be necessary to find out whether bacterial predation and bacterial lysis due to phages infection vary with depth, as it has been suggested elsewhere (Weinbauer & Höfle, 1998; Hoffer & Sommaruga, 2001; Bettarel *et al.*, 2004). In addition, we sampled in the middle of the lake. It is also possible that lysis and grazing impacts may vary with the horizontal spatial scale, and that there may be major variations between near the shore and that far from the shore. This should also be investigated in the future. At last, an effort should be made to obtain high frequency sampling (several times a day) to have a better picture of phage-bacteria dynamics (Winter *et al.*, 2004).

The filtration process and contamination problems

We could not avoid contamination by small heterotrophic flagellates (undetermined unflagellates, small chrysomonads and cryptomonads forms) in the <2 µm final sample. We are well aware that for some situations significant numbers of grazers may even pass through a 0.8 µm filter but we did not find such a contamination in preliminary tests (unpublished data). This is why we used as a final step the <2 µm filter for evident facility (time-consuming manipulation) reasons. The contamination rates varied depending on the period, and especially according to taxon. Among the potential mixotrophs, some *Cryptomonas* also slipped through filters. The estimated grazing rates in the < 2µm fraction allowed us to conclude that the presence of grazers induced relatively little mortality compared to the virus-mediated mortality for the first 24 h incubation. In addition, it is possible that these small flagellates could also have reduced the concentrations of viruses (Gonzales & Suttle, 1993) so that the impact of the viruses we found may in fact be underestimated. Also, it has been reported recently that grazing may enhance viral activity so that the reduction/elimination of the predators could lead to under-estimations of viral activity (Simek *et al.*, 2001; Weinbauer *et al.*, 2003). At the very last, the filtration process could be responsible for cell destruction with nutrient enrichment contributing in some way to the bacterial growth but likely different according to the period. Although filtration process had inherent problems, our results allowed us to think that the method of communities fractionation based on filtration remain very useful to study microbial communities' interactions when sufficient care is taken with filtration and assessment of possible bias (contamination) is done.

The dilution experiment

The impact of viruses on bacterial mortality has been studied using different approaches: the direct observation of infected cells by using TEM, the analysis of viral decay rates by using the cellular poison potassium cyanide, the radiotracer incorporation into

virio plankton biomass and the utilization of fluorescently labeled viruses as tracers. Only a couple of studies used the dilution method. For instance, Evans *et al.* (2003) used it to quantify simultaneously both grazing and viral-induced mortality in coastal waters of the Norwegian Sea, and they estimated the viral-induced mortality of the picophytoplankter *Micromonas* spp. standing stock to be 9-25% per day. It was found that on a particular day, viral lysis caused the loss of 50% of *Micromonas* spp. production. The reverse approach, consisting of increasing the concentration of active viruses in natural water incubations, has been used more often but again usually applied to marine bacterio- or phytoplankton (Proctor & Fuhrman, 1992; Hewson *et al.*, 2001; Eissler & Quinones, 2003). As a recent example, Noble *et al.* (1999) were able to increase bacterial mortality attributed to virus infection and stimulate the growth of subpopulations of non-infected heterotrophic bacterioplankton. In virioplankton-enriched seawater incubations lasting 24 h, a 25-40% decline in bacterioplankton abundance has generally been observed (Wommack & Colwell, 2000; Sime-Ngando *et al.*, 2003). A very interesting perspective will be to compare these two methods (dilution vs. enrichment) to assess viral-induced bacterial mortality.

We can also point out that there may be a fundamental difference in the use of a Hassett-Landry approach for estimating zooplankton grazing rates and using the same approach to try and estimate the amount of mortality inferred as the result of viral lysis. In the Hassett-Landry approach, it is assumed that the loss of bacteria is the result of collision between a predator and a cell. However, in the viral dilution experiment, cell lysis may initially be the result of infections that occurred before the experiment was begun. Depending on the length of the lytic cycle and the time of infection, lysis resulting from infections that occurred before the experiment could be maintained for a considerable period of time. The length of the lytic cycle is usually relatively tightly tied to the growth rate of the bacteria. In the case of the studies presented here, we chose to focalize on the first 24 h of incubation. This is in the same time-frame as the length of the lytic cycle. Consequently, we may keep in mind that it is possible that many of the infection events that occurred during the incubation would not have resulted in cell lysis during the period that the experiment was monitored.

Dilution-FCM vs. TEM estimations of viral lysis induced mortality of bacteria

According to our results, the different methods led to different conclusions. However, both of them reported a potentially important role of viruses as agents of mortality to the bacterial community in Lake Bourget. This conclusion agrees with the recent publication of Fischer & Velmirov (2002), who studied the magnitude of viral control on bacterial production in a eutrophic oxbow lake of the River Danube using several approaches (viral decay method, estimation of the frequency of infected bacterial cells). They observed large variations between the methods, indicating that the use of one single method is not reliable to decide whether a detected trend is representative of a specific system. With TEM, some assumptions have to be made to obtain the virus-mediated bacterial mortality so that errors or inadequacies are possible (Binder, 1999). There is also a possibility that some infected cells could be lost by disruption during ultracentrifugation, and they could also have been inappropriately scored as non infective due to the darkening of cells by electrons. In addition, samples analyzed by TEM were kept for a few days before being sent to the Laboratory of colleagues for delayed analysis. This makes it tempting to say that all the steps between sampling and analysis could account for the fact that results of the two methods were so different. An effort will have to be made in the future to reduce or eliminate this delay or at least to make it similar for the different methods. At last, the TEM/FIC method does not take into account diel cycles in viral infection of bacterioplankton and the estimate is thus dependent on the time of the day the samples are taken. This problem has been recently highlighted by Winter *et al.* (2004).

Grazing

The benefits and advantages of the fluorescent micro-beads technique have been extensively discussed in the literature (Vaqué *et al.*, 1994; Bratvold *et al.*, 2000; Cleven & Weisse 2001; Sherr & Sherr, 2002). Although possible problems inherent to the method, we used the tracer approach as a "near standard" method during this study. The main shortcomings are the possible selective grazing behaviour against microspheres as an artificial prey, the possible quick egestion of beads by some taxa, and the size selectivity of bacterivorous flagellates. Although previous work has shown that protozoa can discriminate strongly against fluorescent microspheres (Pace & Bailiff, 1987; Sanders *et al.*, 1989), Boenigk *et al.* (2002) recently demonstrated the absence of any selectivity between inert or living particles in interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. Moreover, beads resist to digestion and are easy to see in vacuoles of bacterivores and make possible to measure taxon specific grazing rates. Therefore, fluorescent microspheres appeared be a reasonable approach for comparing relative changes in ingestion rates and measuring relative predation impact of different bacterivores (Carias *et al.*, 1996; Thouvenot *et al.*, 1999). Recently, Bettarel *et al.* (2003a) used the fluorescent micro beads method to compare the potential impact of heterotrophic nanoflagellates grazing to the viral lysis impact on heterotrophic bacteria.

We attempted to optimize the technique as far as possible, taking into account among other things, the predation kinetics for the main flagellate taxa, and the bacterial size structure in Lake Bourget. Also, we have to keep in mind that the technique used to correct for the grazer "contaminants" involved a short-term incubation looking at ingestion. It is not impossible that this contrast between the 15 min experiment and its extrapolation to 24 h to compare with the viral impact may be a source of potential errors or biases.

Impact of viruses vs. protozoa

Results from the dilution experiments suggested that the daily removal of bacteria in response to viral lysis ranged from 35 to 60%, depending on the season. As we have already said, these values are in the range already reported for aquatic ecosystems (Wommack & Colwell, 2000; see Table 2). The impact of lysis in Lake Bourget seemed to be higher than in the oligotrophic Lake Pavin (6-16%) but definitely lower than in the eutrophic ecosystems such as Lake Plussée (up to 97%) or the Sep reservoir (up to 60%). The same can be said concerning our burst size values and those reported in the literature. It therefore seems that our data contribute to the general proposal that viral production increase with eutrophication in freshwater ecosystems (Weinbauer *et al.*, 2003).

Concerning the grazing impact, both filtration rates and ingestion rates measured for flagellates were in the range of values reported in other freshwater systems (Table 3). However the predation rates measured for heterotrophic flagellates were higher in Lake Bourget than those measured in the oligotrophic Lake Annecy or the oligomesotrophic Lake Pavin (Carias *et al.*, 1996; Bettarel *et al.*, 2003a; Domaizon *et al.*, 2003), due to the higher abundance of flagellates. The bacterial mortality induced by mixotroph grazing was high as well, but remained lower than that reported for Lake Annecy. Finally, we only considered grazing by flagellates but we may wonder the relative importance of the ciliates. In fact, parallel investigations allowed us to estimate that, for all 3 experiments, predation pressure by the ciliates on bacteria was very low (with a maximum grazing impact of 1.2% of bacterial mortality).

Few studies have investigated the comparative importance of viral lysis and protozoan grazing simultaneously, especially in freshwater ecosystems. All but 3 of the available studies have reported lower mean viral lysis than protist grazing. Fisher & Velmirov (2002) have

reported less grazing predation on bacteria than viral lysis that ranged from 55.7 to 62.7% of bacterial production, and thus was eleven-fold greater than the heterotrophic nanoflagellates grazing. Bettarel *et al.* (2004) also reported at specific times of the year that viral lysis could prevail over protistan grazing in the anoxic hypolimnion zone of the eutrophic Lake Aydat. Similar observations were reported by Weinbauer & Höfle (1998) and predicted by Pedros-Alio *et al.* (2000). We were in a similar situation, with viral lysis exceeding predation in our last experiment, *i.e.* in summer, but still within a range that was definitely lower than that reported by Fisher & Velmirov (by a factor of 2). When we considered the per capita grazing impact of heterotrophs and mixotrophs, viral control exceeded flagellate grazing only during the third experiment but, if we considered only heterotrophs grazing (as did Fisher & Velmirov) the virus-mediated mortality (measured by dilution method) exceeded HNF grazing for all three experiments. In their study, Simek *et al.* (2001) reported that protist grazing and viral lysis were responsible for 50 and 25% respectively of bacterioplankton mortality. As said above, one of their experiments was grazer-free, and this showed that in such a situation, there was a lower percentage of cell mortality due to viruses (*i.e.* 17%) suggesting an apparent synergism between grazing and virus-induced mortality. Simek *et al.* (2001) speculated that their fractionation (*i.e.* $<0.8\ \mu\text{m}$) reduced bacterial diversity and that there may be a reciprocal relationship between the diversity of a bacterial community and virus-induced mortality. Alternatively, infection rates may shift with changes in individual cells. Cell-specific production and activity are stimulated by grazing due to the release of organic and inorganic nutrients. Higher growth rates might be associated with enhanced receptor formation on the cell surface, which may result in a greater chance of phage attachment and thus higher infection frequencies.

Seasonally induced changes act as important structuring forces for Lake Bourget bacterial communities. Viruses and protozoa are important controllers of the bacterial biomass. As with previous studies, our study shows that parasitism by viruses may have a similar and even stronger impact than protozoan bacterivory on bacterial loss (Weinbauer & Höfle, 1998; Fisher & Velmirov, 2002; Bettarel *et al.*, 2004). Many avenues of research are now possible. Among them, the relative importance of phytoplankton (including picocyanobacteria) compared to bacterioplankton as a significant host reservoir for viruses in fresh water needs to be further investigated. Heterotrophic protists may be indirectly related to viruses via the bacterial compartment, but no correlation between the two communities has ever been found to date. In the near future, we will also focus on other large pre-alpine lakes such as Lakes Annecy and Geneva. Indeed, potential ecosystem differences in micro-grazer activity, viral lysis and *in fine* trophic structure and function still constitute a major uncertainty for biogeochemical models that seek to predict the role of the microbial community role in carbon cycling on the basis of bacterial parameters alone. There is still an insufficient amount of data, especially in freshwater ecosystems, on seasonal and depth-related variability of virus-mediated bacterial mortality as well as relationships related to the trophic status of a system. Lastly, it will also be necessary to initiate studies to compare the different methodologies used in order to assess virus-mediated bacterial mortality.

Table 3: Virioplankton abundance, VBR (Virus:Bacteria Ratio), BS (the burst size or the number of virus particles released upon host cell lysis), FVIC (the Fraction of Visibly Infected Cells), FIC (the estimation of the total Fraction of Infected Cells) and VIBM (the Virus-Induced Bacterial Mortality) in some European lakes. O: Oligotrophic, M: Mesotrophic and E: Eutrophic. nd: Not determined.

Lake and location	Status	Abundance ($\times 10^6$ Part mL ⁻¹)	VBR	BS	FVIC or FIC (%)	VIBM (%)	Reference
Gossenköllesee, Austria	O	<0.02 - <5 1-10	0.1-11 4-31	4-45	0.9-2.3	5-28	Höfer & Sommaruga (2001) Pina <i>et al.</i> (1998)
Rédo, central Pyrenees	O	3-30	9-43				Pina <i>et al.</i> (1998)
Constance, Germany	M	10-40		21-121	0-1.8 1-17	0.11-18.4	Hennes & Simon (1995)
Plussee, Germany	E	0.3->200	19-35	19-87	0.5-3.4	7.7-97.3	Bergh <i>et al.</i> (1989) Demuth <i>et al.</i> (1993) Weinbauer & Hoffle (1998)
Kalandsvannet, Norway			50		2-16	2-24 h ⁻¹	Heldal & Bratbak (1991)
Pavin, France	O-M	10-54	4-13	13-54	0.5-3.1	2-74	Bettarel <i>et al.</i> (2003, 2004)
Aydat, France	E	25-99	4-14	16-60	0.4-2.8	1-38	Bettarel <i>et al.</i> (2003, 2004)
Sep Reservoir, France	O-M	8-130	2-12	8-140	0.5-3.7	5-60	Pradeep Ram <i>et al.</i> (unpublished)
Alte Donau, Austria	E	17-117	4-39		2.3-9	55-63	Fisher & Velmirov (2002)
Rimov reservoir, Czech Republic	M-E	8-47 13-69	 4-40	 19-40	1.7-4 1.1 -5.2	15-37 d ⁻¹ 18-66 d ⁻¹	Simek <i>et al.</i> (2001) Weinbauer <i>et al.</i> (2003)
Gäddtjärn	O	22-23.5	3-12	6-18	9-41 (23)		Vrede <i>et al.</i> (2003)
Fisklösen (Sweden)	O	29-31	5-24	6-21	10-43 (25)		
Bourget, France	M	47-100	5-27	11-49	1.2-1.9 8-14.5	9.3-19.2	Jacquet <i>et al.</i> (this study)

Table 4: Ingestion rates, per capita grazing impact of heterotrophic and mixotrophic flagellates and flagellates grazing-induced bacterial removal in lakes differing in their trophic status. O: Oligotrophic, M: Mesotrophic and E: Eutrophic.

Ingestion rates Bacteria Ind ⁻¹ h ⁻¹ (large variation according to taxon)	Per capita Grazing rates Bacteria L ⁻¹ h ⁻¹	% loss due to grazing BSS : bacterial standing stock BP : bacterial production	Method ^a	Site	Status	Reference
Heterotrophic flagellates						
1 - 45	Max : 36x10 ⁶	BSS % : 14.7 - 19.2	FMS	Lake Bourget France	M	Jacquet <i>et al.</i> (this study)
1.8 – 72.3	Max : 30.7x10 ⁶	BP % : 0.5 – 115	FMS	Lake Pavin France	O-M	Bettarel <i>et al.</i> (2003)
0 – 15.6	Max : 6.1x10 ⁶	BSS % : 0.2 - 11.7 BP % : 0.1 – 62.3	FMS	Lake Annecy France	O	Domaizon <i>et al.</i> (2003)
0 – 31		BP % : 0.5 – 48.3	FMS	Lake Constance Germany	M-E	Cleven & Weisse (2001)
		BSS % : 8 – 28 (<20µm bacterivores)	FLB	Reservoir Rimov Czech Republic	E	Simek & Kojeka (1999)
21-53						Simek <i>et al.</i> (1997)
0 – 3.3	Max : 1.5x10 ⁶		FMS	Reservoir Sep France	O-M	Thouvenot <i>et al.</i> (1999)
2.2 – 26.5		BP % : 0.3 - 20	FLB	Alte Dauno Austria	E	Wieltschnig <i>et al.</i> (1999)
		BP % : 2.9 – 108		Plussee Germany	E	Weinbauer & Höfle (1998)
10 - 37			FLB	Lake Erie USA	M	Hwang & Heath (1997)
1.6 – 92.4	Max : 18.9x10 ⁶		FMS	Lake Pavin France	O-M	Carrias <i>et al.</i> (1996)
2 - 53		BSS % : Max : 20% BP % : Max : 77%	FMS	Lake Ogleshorpe USA	E	Sanders <i>et al.</i> (1989)
Mixotrophic flagellates						
3.7 - 86	Max : 63x10 ⁶	BSS % : 3.5 – 46.7	FMS	Lake Bourget France	M	Jacquet <i>et al.</i> (this study)
0 – 54.8	Max : 68x10 ⁶	BSS % : 6 – 71.5	FMS	Lake Annecy France	O	Domaizon <i>et al.</i> (2003)
0 - 38.3			FLB	Artificial pond England	E	Hitchmann & Jones (2000)
0 – 137.6	Max : 2.6x10 ⁶		FMS	Reservoir Sep France	O-M	Thouvenot <i>et al.</i> (1999)
1.3 - 87	Max : 4.5x10 ⁶		FMS	Lake Pavin France	O-M	Carrias <i>et al.</i> (1996)
2 - 53			FMS	Lake Ogleshorpe USA	E	Sanders <i>et al.</i> (1989)

^a : FLB : fluorescent labelled bacteria – FMS : fluorescent micro-spheres

References

- Almeida M.A., Cunha M.A. & Alcantara F. (2001) Loss of estuarine bacteria by viral infection and predation in microcosm conditions. *Microbial Ecology*, **42**, 562-571.
- Bergh O., Borsheim K.Y., Bratbak G. & Haldal M. (1989) High abundances of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-468.
- Bettarel Y., Amblard C., Sime-NGando T., Carrias J.-F., Sargos D., Garabetian F. & Lavandier P. (2003a) Viral lysis, flagellate grazing potential and bacterial production in Lake Pavin. *Microbial Ecology*, **45**, 119-127.
- Bettarel Y., Sime-NGando T., Amblard C., Carrias J.-F. & Portelli C. (2003b) Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of different trophic. *Freshwater Biology*, **48**, 810-822.
- Bettarel Y., Sime-NGando T., Amblard C. & Dolan J. (2004) Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied & Environmental Microbiology*, **70**, 2941-2951.
- Binder B. (1999) Reconsidering the relationship between virally induced bacterial mortality and frequency of infected cells. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 207-215.
- Boenigk J., Matz C., Jürgens K. & Arndt H. (2002) Food concentration-dependent regulation of food selectivity of interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 195-202.
- Bratvold D., Sreenc F. & Taub S.R. (2000) Analysis of the distribution of ingested bacteria in nanoflagellates and estimation of grazing rates with flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**, 1-12.
- Calbet A. & Landry M.R. (2004) Phytoplankton growth, microzooplankton grazing, and carbon cycling in marine systems. *Limnology & Oceanography*, **49**, 51-57.
- Campbell L. & Carpenter E.J. (1986) Estimating the grazing pressure of heterotrophic nanoplankton on *Synechococcus* spp. using the sea water dilution and selective inhibitor techniques. *Marine Ecology Progress Series*, **33**, 121-129.
- Caron D. A. (1983) Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 249-268.
- Carrias J.-F., Amblard C. & Bourdier G. (1996) Protistan bacterivory in an oligo-mesotrophic lake: Importance of attached ciliates and flagellates. *Microbial Ecology*, **31**, 249-268.
- Chiura H.X. (1997) Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 75-88.
- Cleven A.J. & Weisse T. (2001) Seasonal succession and taxon specific bacterial grazing rates of heterotrophic nanoflagellates in Lake Constance. *Aquatic Microbial Ecology*, **23**, 147-161.
- Clokier M.R.J., Millard A.D., Wilson W.H. & Mann N.H. (2003) Encapsulation of host DNA by bacteriophages infecting marine *Synechococcus* strains. *FEMS Microbiology Ecology*, **1590**, 1-4.
- Comte J., Jacquet S., Viboud S., Fontvieille D., Paolini G. & Domaizon I. (2006) Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, February to July 2002). *Microbial Ecology*, **52**, 72-89.
- Danovaro R., Dellanno A., Trucco A., Serresi M. & Vanucci S. (2001) Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied & Environmental Microbiology*, **67**, 1384-1387.

- Degans H., Zöllner E., Van der Gucht K., De Meester L. & Jürgens K. (2002) Rapid Daphnia-mediated changes in microbial community structure: an experimental study. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**, 137-149.
- Demuth J., Neve H. & Witzel K. (1993) Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in Lake Plusssee. *Applied & Environmental Microbiology*, **59**, 3378-3384.
- Domaizon I., Viboud S. & Fontvieille D. (2003) Taxon specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria on the oligotrophic Lake Annecy - Importance of mixotrophy. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**, 317-329.
- Dorigo U., Jacquet S. & Humbert J.-F. (2004) Cyanophage diversity inferred from g20 sequence analyses in the largest natural French lake, Lake Bourget. *Applied & Environmental Microbiology*, **70**, 1017-1022.
- Eissler Y. & Quinones R.A. (2003) The effect of viral concentrate addition on the respiration rate of *Chaetoceros gracilis* cultures and microplankton from a shallow bay (Columo, Chile). *Journal of Plankton Research*, **25**, 927-938.
- Evans C., Archer S.D., Jacquet S. & Wilson W.H. (2003) Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquatic Microbial Ecology*, **30**, 207-219.
- Farnell-Jackson E.A. & Ward A.K. (2003) Seasonal patterns of viruses, bacteria and dissolved organic carbon in riverine wetland. *Freshwater Biology*, **48**, 841-851.
- Fischer U.R. & Velimirov B. (2002) High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 1-12.
- Fuhrman J.A. & Noble R.T. (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology & Oceanography*, **40**, 1236-1242.
- Fuhrman J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541-548.
- Gonzales J.M. & Suttle C.A. (1993) Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles: ingestion and digestion. *Marine Ecology Progress Series*, **94**, 1-10.
- Guixa-Boixereu N., Calderon-Paz J.I., Haldal M., Bratbak G. & Pedros-Alio C. (1996) Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquatic Microbial Ecology*, **11**, 215-227.
- Guixa-Boixereu N., Lysnes K. & Pedros-Alio C. (1999) Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 1949-1958.
- Haldal M. & Bratbak G. (1991) Production and decay of viruses in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series*, **72**, 205-212.
- Hennes K.P. & Simon M. (1995) Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Applied & Environmental Microbiology*, **61**, 333-340.
- Hewson I., O'Neil J.M., Heil C.A., Bratbak G. & Demison W.C. (2001) Effects of concentrated viral communities on photosynthesis and community composition of co-occurring benthic microalgae and phytoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 1-10.
- Hitchman R.B. & Jones H.L.J. (2000) The role of mixotrophic protists in the population dynamics of the microbial food web in a small artificial ponds. *Freshwater Biology*, **43**, 231-241.
- Hoffer J.S. & Sommaruga R. (2001) Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: importance of filamentous forms. *Aquatic Microbial Ecology*, **26**, 1-11

- Höfle M.G., Haas H. & Dominik K. (1999) Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 3164-3174.
- Hwang, S.G. & Heath R.T. (1997) Bacterial productivity and protistan bacterivory in coastal and offshore communities of Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **54**, 788-799.
- Jacquet, S., Briand J.-F., Leboulanger C., Avois-Jacquet C., Paolini G., Oberhaus L., Tassin B., Vinçon-Leite B., Druart J.-C., Anneville O. & Humbert J.-F. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* (in press).
- Jiang, S.C & Paul J.H. (1994) Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, **104**, 163-172.
- Jürgens K. (1994) Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs - a review. *Marine Microbial Food Webs*, **8**, 295-324.
- Kepner R.L., Wharton R.A. & Suttle C.A. (1998) Viruses in Antarctic lakes. *Limnology & Oceanography*, **43**, 1754-1761.
- Klut M.E. & Stockner J.G. (1990) Virus-like particles in an ultra-oligotrophic lake on Vancouver Island, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **47**, 725-730.
- Landry M.R. & Hassett R.P. (1982) Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Marine Biology*, **67**, 283-288.
- Landry M.R., Monger B.C. & Selph K.E. (1993) Time-dependency of microzooplankton grazing and phytoplankton growth in the subarctic Pacific. *Progress in Oceanography*, **32**, 205-222.
- Landry M.R., Kirshtein J. & Constantinou J. (1995) A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, **120**, 55-63.
- Larsen A., Fones G.A., Flaten F., Sandaa R.A., Castberg T., Thyrrhaug R., Erga S.R., Jacquet S. & Bratbak G. (2004) Spring phytoplankton bloom in Norwegian coastal waters: Microbial community dynamics, succession and diversity. *Limnology & Oceanography*, **49**, 180-190.
- Laybourn-Parry J., Höfer J. & Sommaruga R. (2001) Viruses in the plankton of freshwater and saline Antarctic lakes. *Freshwater Biology*, **46**, 1279-1287.
- Leff A.A., Leff L.G., Lemke M.J., Heath R.T. & Gao X.Q. (1999) Abundance of planktonic virus-like particles in Lake Erie subsurface waters. *Virology*, **248**, 35-45.
- Maranger, R. & Bird D.F. (1995) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series*, **121**, 217-226.
- Maranger, R., and D. F. Bird. 1996. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Quebec. *Microbial Ecology*, 31:141-151.
- Marie D., Brussard C., Bratbak G. & Vaulot D. (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 45-52.
- Mathias C.B., Kirschner A.K.T. & Velmirov B. (1995) Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a Backwater system of the Danube River. *Applied & Environmental Microbiology*, **61**, 3734-3740.
- Noble R.T., Middelboe M. & Furhman J.A. (1999) Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 1-13.

- Pace M.L. & Bailiff M.D. (1987) Evaluation of a fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. *Marine Ecology Progress Series*, **40**, 185-193.
- Pedros-Alio C., Calderon-Paz J.I. & Gasol J.M. (2000) Comparative analysis shows that bacterivory, not viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbiology Ecology*, **32**, 157-165.
- Pina S., Creus A., Gonzales N., Girones R., Felip M. & Sommaruga R. (1998) Abundance, morphology and distribution of planktonic virus-like particles in two high-mountain lakes. *Journal of Plankton Research*, **20**, 2413-2421.
- Pradeep Ram A. S., Boucher D., Sime-Ngando T., Debroas D. & Romagoux J. C. (2005) Phage bacteriolysis, protistan bacterivory, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. *Microbial Ecology*, **50**, 64-72.
- Proctor L.M. & Fuhrman J.A. (1992) Mortality of marine bacteria in response to enrichments of the virus size fraction from seawater. *Marine Ecology Progress Series*, **87**, 283-293.
- Sanders R.W., Porter K.G., Bennett S.J. & Debiase A.E. (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnology & Oceanography*, **34**, 673-687.
- Sherr E.B & Sherr B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antoine van Leeuwenhoek* **81**, 293-308.
- Simek K. & 7 co-authors (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied & Environmental Microbiology*, **67**, 2723-2733.
- Simek K., Vrba J., Pernthaler J., Posch T., Hartman P., Nedoma J. & Psenner R. (1997) Morphological and composition shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied & Environmental Microbiology*, **63**, 587-595.
- Sime-Ngando T., Bettarel Y., Chartogne C. & Sean K. (2003) The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Research Development Microbiology*, **7**, 481-497.
- Simek, K. & Kojeka P. (1999) Shifts in bacterial community composition associated with different macrozooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology & Oceanography*, **44**, 1634-1644.
- Sime-Ngando T., Mignot J. P., Amblard C., Bourdier G., Desvillettes C. & Quiblier-Lloberas C. (1996) Characterization of planktonic virus-like particles in a French mountain lake: methodological aspects and preliminary. *International Journal of Limnology*, **32**, 259-263.
- Sommaruga R., Krössbacher M., Salvenmoser W., Catalan J. & Psenner R. (1995) Presence of large virus-like particles in a eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, **9**, 305-308.
- Suttle C.A. (1994) The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*, **28**, 237-243.
- Tapper M.A. & R.E. Hicks (1998) Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton. *Limnology & Oceanography*, **43**, 95-103.
- Thingstad T.F. & Lignell R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 19-27.
- Thouvenot A., Richardot M., Debroas D. & Dévaux J. (1999) Bacterivory of metazooplankton, ciliates and flagellates in a newly flooded reservoir. *Journal of Plankton Research*, **21**, 1659-1679.
- Vaqué D., Gasol J.M. & Marrassé C. (1994) Grazing rates on bacteria: the significance of methodology and ecological factors. *Marine Ecology Progress Series*, **109**, 263-274.

- Vaulot D. (1989) CytoPC: processing software for flow cytometric data. *Signal & Noise*, **2**, 8.
- Vaulot D., Romari K. & Not F. (2002) Are autotrophs less diverse than heterotrophs in marine picoplankton? *Trends in Microbiology*, **10**, 266-267.
- Vrede K., Stensdotter U. & Lindström E.S. (2003) Viral and bacterioplankton dynamics in two lakes with different humic contents. *Microbial Ecology*, **46**, 406-415.
- Weinbauer M.G. & Peduzzi P. (1994) Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes. *Marine Ecology Progress Series*, **108**, 11-20.
- Weinbauer M.G. & Höfle M.G. (1998) Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Applied & Environmental Microbiology*, **64**, 431-438.
- Weinbauer M.G., Winter C. & Höfle M.G. (2002) Reconsidering transmission electron microscopy based estimates of viral infection of bacterioplankton using conversion factors derived from natural communities. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 103-110.
- Weinbauer M.G., Christaki U., Nedoma J. & Simek K. (2003) Comparing the effects of resource enrichment and grazing on viral production in a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, **31**, 137-144.
- Weinbauer M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Review*, **28**, 127-181.
- Weinbauer M.G. & Rassoulzadegan F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, **6**, 1-11.
- Weisse T. & Scheffel-Möser U. (1990) Growth and grazing loss rates in single-celled *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae). *Marine Biology*, **106**, 153-158.
- White P.A., Kalff J., Rasmussen J.B. & Gasol J.M. (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microbial Ecology*, **21**, 99-118.
- Wieltschnig C., Wihlidal P., Ulbricht A., Kirschner, A.K.T. & Velimirov B. (1999) Low control of bacterial production by heterotrophic flagellates in a eutrophic backwater environment. *Aquatic Microbial Ecology*, **17**, 77-89.
- Wilcox R.M. & Fuhrman J.A. (1994) Bacterial viruses in coastal seawater: lytic rather than lysogenic production. *Marine Ecology Progress Series*, **114**, 35-45.
- Wilhelm S.W. & Suttle C.A. (1999) Viruses and nutrient cycles in the sea. *Biosciences*, **49**, 781-788.
- Wilhelm S.W. & Smith R.E.H. (2000) Bacterial carbon production in Lake Erie is influenced by viruses and solar radiation. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **57**, 317-326.
- Wilhelm S.W., Brigden S.M. & Suttle C.A. (2002) A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microbial Ecology*, **43**, 168-173.
- Winter C., Herndl G.J. & Weinbauer M.G. (2004) Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **35**, 207-216.
- Wommack K.E. & Colwell R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology Review*, **64**, 69-110.
- Yannarell A.C., Kent A.D., Lauster G.H., Kratz T.K. & Triplett E.W. (2003) Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different humic trophic status. *Microbial Ecology*, **46**, 391-405.

Assessing the microbial community dynamics and the role of bacteriophages as bacterial mortality agents in Lake Geneva

Journal of Water Sciences (2006) 19, 115-126

Solange DUHAMEL¹, Isabelle DOMAIZON-PIALAT², Sébastien PERSONNIC¹, Stéphan JACQUET^{2*}

1 *UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, 74203 Thonon cedex, France*

2 *UMR CARRTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Université de Savoie, 73376 Le Bourget-du-Lac cedex, France*

* To whom correspondence should be addressed

jacquet@thonon.inra.fr ; Tel: +33.4.50.26.78.12 ; Fax : +33.4.50.26.07.60

Keywords: Lake, protists, viruses, bacteria, bacterial mortality, communities' dynamics, dilution method

Abstract

The aims of this work have been to study, for the first time, the succession of 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. Both nanoflagellates and viruses could be responsible for 31 to 42% of the total daily mortality of heterotrophic bacteria. In May (Exp2), viruses could explain up to 10% of the bacterial mortality whereas flagellates were responsible for 32% of the bacterioplankton removal. These results provide a new evidence of the critical role played by viruses in the functioning of the microbial food webs and highlights the importance to consider further this biological compartment for a better understanding of plankton ecology of Lake Geneva.

Résumé

Dans ce travail, nous étudions, pour la première fois, la dynamique des communautés microbiennes (des virus aux ciliés) dans le plus grand lac naturel d'Europe occidentale (le Léman) et les résultats d'expériences réalisées *in situ* afin d'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 ensemble de 31 à 42% de la mortalité bactérienne journalière. En mai, les virus expliquaient à eux seuls 10% de la mortalité bactérienne et les nanoflagellés 32%. L'ensemble des résultats acquis met en évidence l'importance des virus dans le fonctionnement du réseau trophique microbien et la nécessité de considérer désormais ce compartiment biologique pour mieux comprendre l'écologie planctonique du Léman.

1. Introduction

It is only in the past 15 years that it has been realised how viruses are an important biological compartment in aquatic microbial food webs. In the 1970's, TORELLA & MORITA (1979) demonstrated that viruses present in seawater were more abundant than beforehand reported ($>10^4$ viral particles per millilitre). Then, other researchers corroborated this observation measuring viral abundances in a typical range of 10^9 to 10^{10} viral particles per litre in seawaters or lakes (BORSHEIM *et al.*, 1990 ; PAUL *et al.*, 1991). Henceforth, high viral abundances have been observed worldwide, in seawaters (BERGH *et al.*, 1989 ; PROCTOR & FUHRMAN, 1990), coastal waters (SUTTLE *et al.*, 1990 ; PAUL *et al.*, 1991) and freshwaters (KLUT & STOCKNER, 1990 ; BERGH *et al.*, 1989) ; in marine (PAUL *et al.*, 1993) and freshwater sediments (MARANGER & BIRD, 1995); and in the annual ice of the Polar Sea as well (MARANGER *et al.*, 1994).

Because they are very abundant and have a wide taxonomic and functional diversity, microorganisms play a predominant role in matter and energy fluxes within aquatic ecosystems. Viruses have been shown to be important controlling agents of planktonic community composition, diversity and succession, playing a key role in cell mortality and nutrient cycles (BERGH *et al.*, 1989 ; SUTTLE, 1994 ; MARANGER & BIRD, 1995 ; FUHRMAN, 1999 ; WOMMACK & COLWELL, 2000 ; WEINBAUER & RASSOULZADEGAN, 2004). Of additional ecological significance, the ability of aquatic viruses to transfer genetic material has been demonstrated (CHIURA, 1997 ; CLOKIE *et al.*, 2003). It is noteworthy that the large majority of aquatic viral ecological studies have been carried out in seawater (see FUHRMAN, 1999 ; WOMMACK & COLWELL, 2000 ; WEINBAUER, 2004 ; WEINBAUER & RASSOULZADEGAN, 2004) and there is only one review dealing with freshwater viral ecology (SIME-NGANDO *et al.*, 2003).

It is important to understand the mechanisms responsible for the mortality of aquatic bacteria and phytoplankton. Indeed, different ways of microbial mortality yield different pathways of organic matter flow and oxydation in the ecosystem. In marine ecosystems for instance, SUTTLE & CHEN (1992) estimated that 4-13% of the bacterial community would have to be infected daily and that 8-26% of the bacterial mortality could be explained by viral lysis in marine ecosystems. FUHRMAN & NOBLE (1995) demonstrated that viruses can have a significant impact on the cycling of organic matter in the pelagic microbial food web since they are capable of contributing to as much as half of the heterotrophic bacterial mortality in coastal waters. In fresh water ecosystems, viruses have also been shown to play a crucial role as bacterial mortality agents with daily bacterial removal reaching exceptionally up to 97% (WEINBAUER & HOFLE 1998). More generally, the impact of the viruses is very similar to what has been recorded in the marine field with bacterioplankton mortality varying between 10 and 60% (BETTAREL *et al.*, 2003a, b ; 2004; FISHER & VELMIROV, 2002 ; SIMEK *et al.*, 2001 ; JACQUET *et al.*, 2005).

The aim of this study was to assess the relative impact of viruses and flagellate protozoa on the fate of heterotrophic bacterial communities at two different periods of the year in Lake Geneva. Moreover, the dynamics of the different biological compartments of the microbial loop, including viruses, heterotrophic bacteria, picocyanobacteria, pigmented and heterotrophic flagellates and ciliates was also monitored between February and June 2004. This survey allowed us to select for two different periods of the year between February and June to perform our "mortality experiments", on the basis of clearly different population concentrations and dynamics.

2. Materials and Methods

2.1 Study site.

Lake Geneva (46°27'N, 06°32'W) is the largest natural occidental European lake, and is located in the eastern part of France. It is an elongated (72.3 and 13.8 km in length and width respectively) and West-Est orientated lake, with an area of 580.1 km², a total volume of 89x10⁹ m³, maximum and average depths of 309.7 m and 152.7 m respectively, and a water residence time of approximately 11.4 years. It has a catchment's area of about 7,395 km², with an average altitude of 372 m. It is a mesotrophic lake according to OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) criteria.

2.2 Communities' dynamics.

To assess the dynamics of microbial communities (*i.e.* viruses, heterotrophic bacteria, picocyanobacteria, pigmented picoeukaryotes, nanoflagellates and ciliates) we used flow cytometry (FCM) and epifluorescence microscopy (EFM). Samples were taken at the reference station of the lake named SHL2 which corresponds to the maximum depth of the ecosystem. Eight depths: 2,5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 ; 30 and 50 m were monitored once or twice a month between February and June 2004.

2.3 Experimental set-up to estimate the impact of viruses and flagellate protozoa on bacteria.

A dilution approach initially introduced by LANDRY & HASSET (1982) and refined by LANDRY *et al.* (1995) has been routinely used as a field technique to quantify grazing of phytoplankton by micro-zooplankton and to estimate phytoplankton growth rate (CAMPBELL & CARPENTER, 1986 ; WEISSE & SCHEFFEL-MOSER, 1990 ; LANDRY *et al.*, 1993 ; CALBET & LANDRY, 2004). We used a modification of this dilution technique to assess the virus-induced mortality of heterotrophic bacteria in Lake Geneva, which was successfully tested on Lake Bourget the year before (JACQUET *et al.*, 2005). Briefly, the technique consists in incubations of water samples after dilution at different levels of the original sample to reduce the abundance of algal and/or bacterial predators and thus to make contact and interactions between predator and prey species less likely to occur with dilution. The net growth rate of the prey can therefore be expected to be highest in the most diluted fractions, provided that there is no nutrient limitation. *In fine*, the method allows an estimate of the grazing impact of zooplankton on phyto- or bacterioplankton. By using 0.02 µm filtered water to dilute the sample, it is thus possible to focus on viral effect. In this study, the impact of flagellate using the dilution method was also compared with the assessment of flagellate grazing using 0.5-µm tracer particles (details can be found in JACQUET *et al.*, 2005).

In the present study, two similar experiments were conducted in March-April (30/03 – 09/04: Exp1) and in May (11/05 – 18/05: Exp2) 2004, which corresponded to distinct periods in terms of water column stratification and of the microbial planktonic dynamics (see below). For each period, an integrated >60-L sample was taken in the 0-10 m surface layer of the reference station. The water sample was first filtered through a series of 100- and 11-µm mesh filters (NYCOM, Buisine, France), and then sequentially filtrated through a 11-µm filter, a 2-µm filter and a 0.2 µm-filter (Nuclepore, Whatman) twice for the latter in order to eliminate all the bacterivores (*i.e.* nanoflagellates and ciliates) and bacteria. A fraction of the 0.2 µm-filtered water was subjected to tangential ultra-filtration using a mini-Ultrasette with a 100

kDa cut-off membrane (Vivaflow, Vivasciences) in order to eliminate all biological entities (including viruses). The purity of the water was checked using both TEM and FCM (data not shown). The 11 μm fraction was mixed in order to obtain fractions of the initial 0.2 μm or 100 kDa-filtered whole water of ca 20, 40, 70 and 100% (also referred to as the control for the latter thereafter). A control bottle containing 0% of the original 0.2 μm or 100 kDa-filtered-water was also prepared for each experiment in order to confirm the absence of plankton contamination from the surrounding environment throughout the experiments (data not shown). For each level of dilution, triplicates were prepared in acid-washed, water rinsed and autoclaved 500 ml polycarbonate bottles (Nalgene, Bioblock). Immediately after being prepared, the bottles were attached in the harbour of the Thonon hydrobiological station and then incubated *in situ* at a depth of 1 m. Population dynamics were monitored during one week, assuming that there were no nutrient limitation and/or confinement effects during incubation. All bottles were sampled daily in the morning and samples were subsequently prepared for FCM analysis.

2.4 FCM and EFM counts.

We used a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488 nm with the standard filter set-up. One ml samples were filtered through 60 μm . Autotrophs were analyzed without adding any fixative or dye. Fluorescent microbeads (Molecular Probes Inc.) of 1 μm in diameter were added to each sample as an internal standard. Viruses and bacteria were fixed with 0.25% glutaraldehyde (final concentration, Sigma). Briefly, for heterotrophic bacteria, samples were diluted with 0.02 μm -filtered water from the lake while for viruses, samples were diluted with 0.02 μm -filtered TE (Tris-EDTA, pH=8) buffer, and then heated for 10 minutes at 75°C. Samples were stained with SYBR Green I (1/10,000 final dilution of stock supplied by manufacturer) for 15 minutes in the dark (more details can be found in MARIE *et al.*, 1999; DORIGO *et al.*, in revision).

Glutaraldehyde (1% final concentration) was used to fix the flagellates. Samples were filtered (pressure < 100 mm Hg) on polycarbonate membranes (diameter: 25 mm, pore size: 0.8 μm), then stained with primulin (CARON, 1983 modified) and stored at the most a few days at -20°C until analysis. Slides were examined under UV light to count the heterotrophic nanoflagellates, and under blue light to count the autotrophic flagellates at a 1,250 x magnification. Green light (545nm) was useful to display phycoerythrin-containing flagellates (*e.g.* Fig. 1).

Ciliates were preserved with mercuric bichloride (2.5%), identified and counted according to SIME-NGANDO *et al.* (1991). The sedimentation of samples was done during 48h in an UTERMOHL column, and the observation was realized with an inverted microscope at a 1,250 x magnification.

Figures 2 to 4 were realized using SIGMAPLOT (SYSTAT Software Inc.). Simple model 1 statistics were used using the same software.

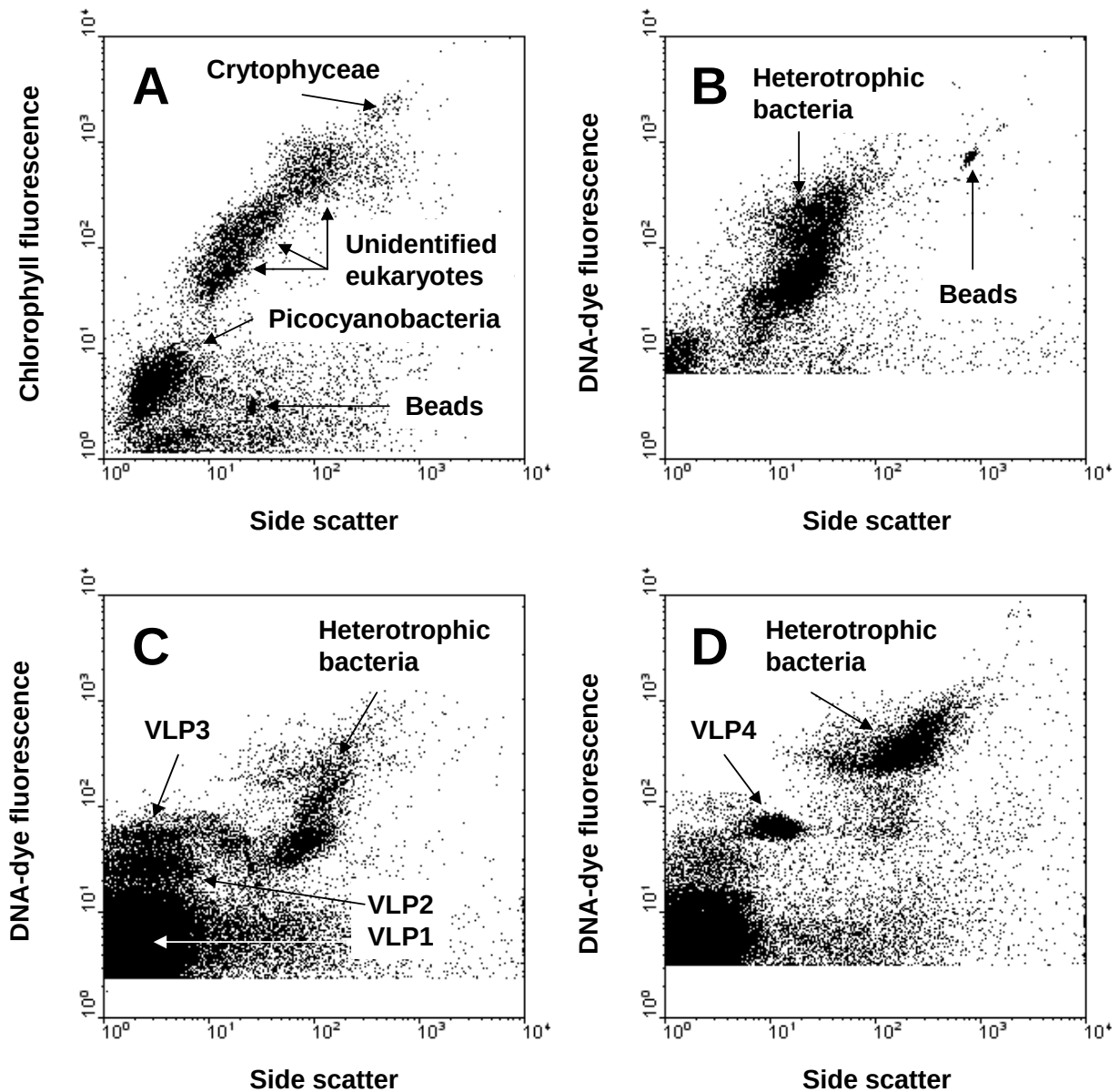


Figure 1: Typical flow cytometric dot plots obtained during the study of the *in situ* microbial populations' dynamics (A, B) and during the experiments dealing with the impact of the viruses and the flagellated protozoa on bacteria (C, D). The flow cytometric signatures of the designated Virus-Like Populations (VLP) referred to as VLP1, VLP2, VLP3 and VLP4, of the picocyanobacteria, the small eukaryotes and the heterotrophic bacteria are indicated. The VLP1 group is likely to correspond to bacteriophages. The VLP2 and VLP3 group might be specific to cyanobacteria (Jacquet, personal observations). The VLP4 is likely to be specific to an eukaryotic alga.

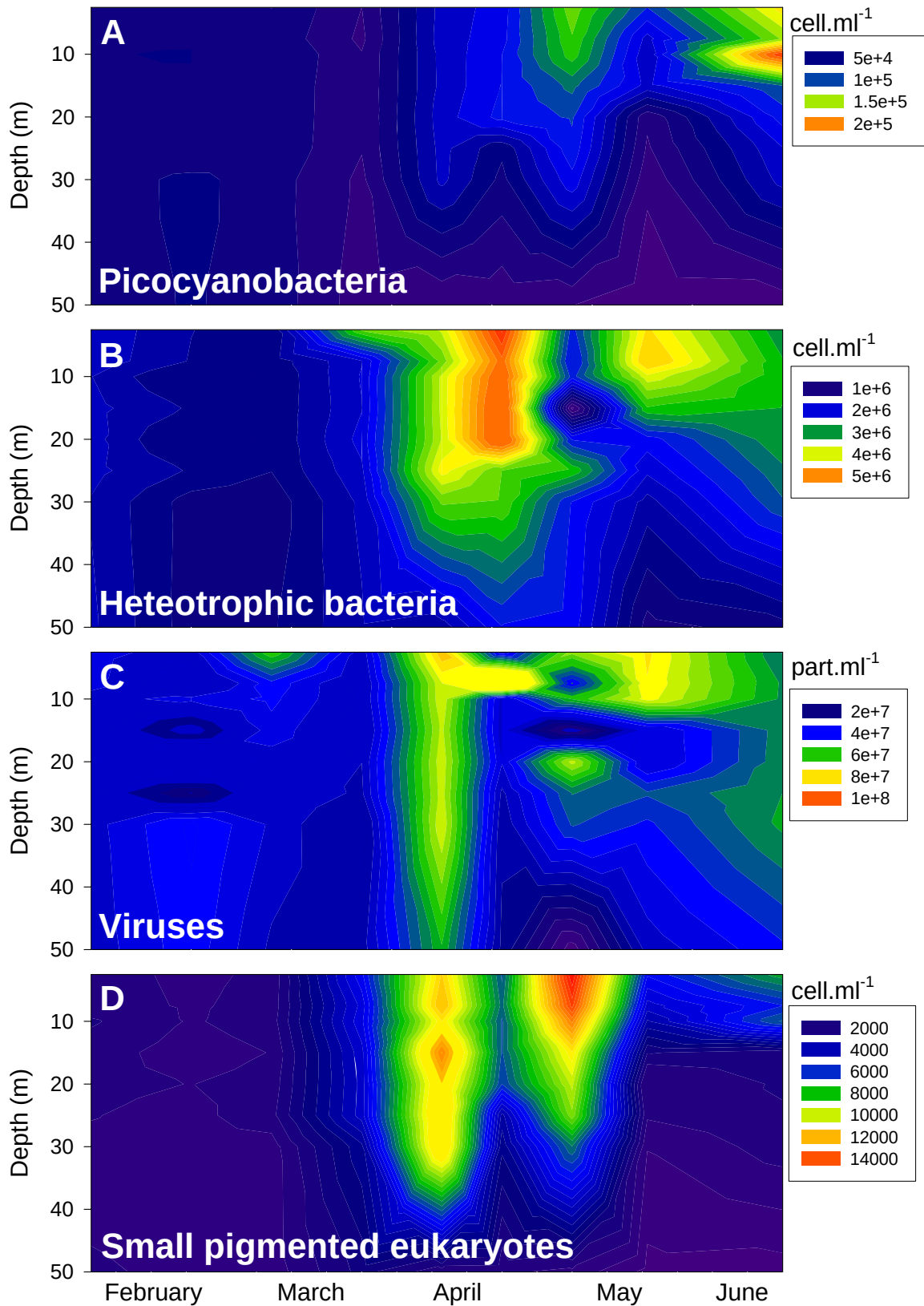


Figure 2: *In situ* population dynamics between February and June 2004. Flow cytometric data from panel A to D. Epifluorescence microscopic data from panel E to H. **Results**

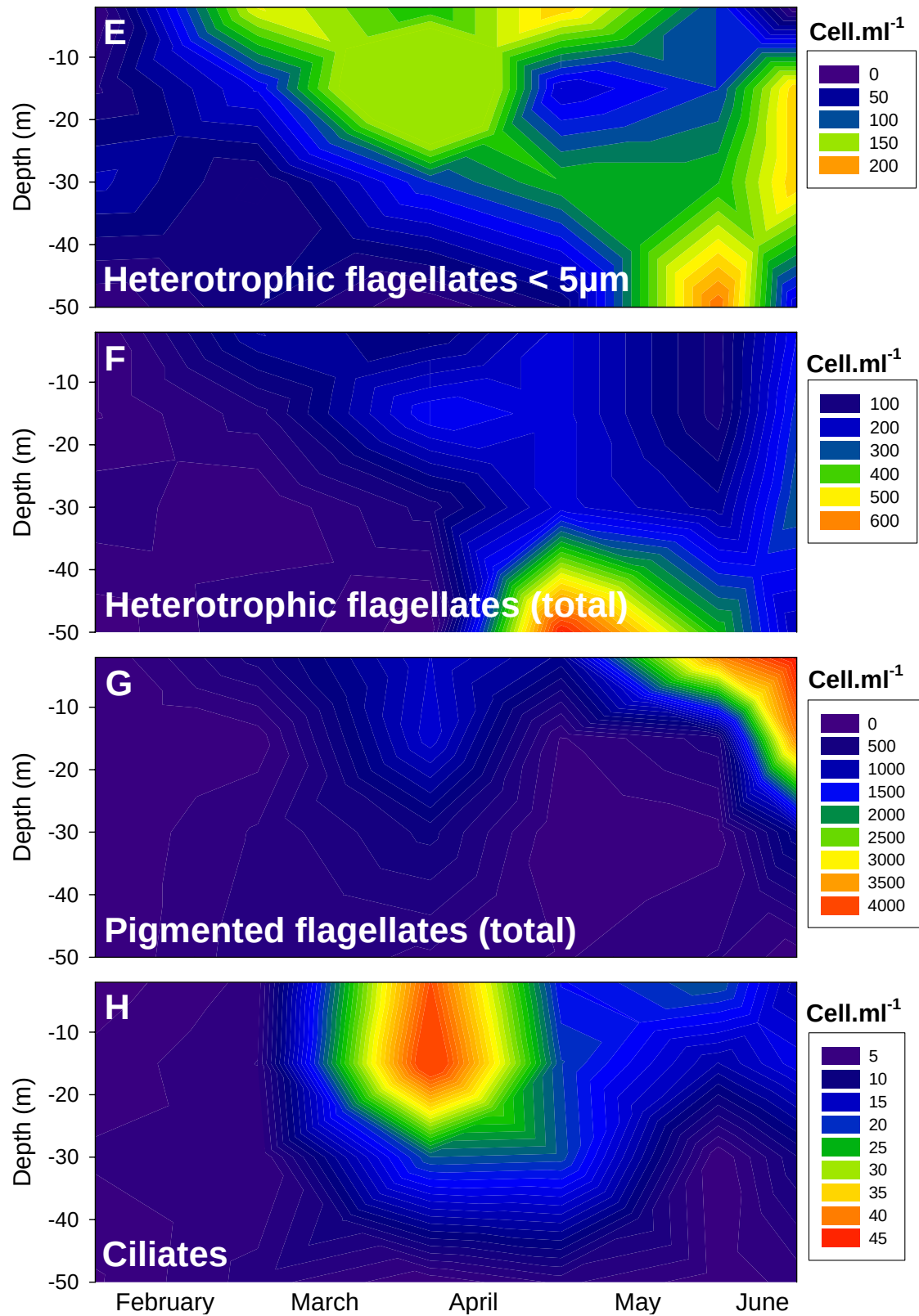


Figure 2' : *In situ* population dynamics between February and June 2004. Flow cytometric data from panel A to D. Epifluorescence microscopic data from panel E to H.

3.1 *In situ* microbial communities' dynamics

There was a clear succession of the different communities sampled between February and June 2004 (Figure 2). The first groups for which the concentrations increased significantly were those of the small pigmented and heterotrophic eukaryotes for which both EFM and FCM revealed different groups (see below). For the small pigmented eukaryotes detected with FCM, two peaks were recorded on April 15 and May 10, reaching up to 14×10^3 cells.ml⁻¹ between 0 and 15 m (Figure 2D, E).

The heterotrophic bacteria dominated in April with a peak at the end of the month (Figure 2B), and were followed by picocyanobacteria (Figure 2A) whose biomass culminated between mid-April and the end of May with a peak at the beginning of May. Whereas the high concentrations of the bacterial communities ($4\text{--}6 \times 10^6$ cells.ml⁻¹) stretched over the first 25 meters, those of the picocyanobacteria ($10\text{--}14 \times 10^3$ cells.ml⁻¹) stretched over only the 15-20 first meters. The highest concentration found for picocyanobacteria was then recorded at the end of June at 10 m depth with 2.2×10^5 cells.ml⁻¹. Within the bacterial community, we could detect at some times two distinct groups already observed previously and referred to as low- and high DNA content bacteria (ROBERTSON & BUTTON, 1989 ; LI *et al.*, 1995 ; MARIE *et al.*, 1996 ; LEBARON *et al.*, 2001 ; SERVAIS *et al.*, 2003). However, the distinction was not so often and we did not find any clear relationships between each of these two groups when detected with the other biological communities.

The viruses, counted as a whole community, presented higher concentrations ($4\text{--}5 \times 10^7$ part.ml⁻¹) in the water column in mid-April and the viral titre increased from the beginning to the end of May ($4\text{--}7 \times 10^7$ part.ml⁻¹), reaching maximum concentration of 8×10^7 particules.ml⁻¹ near the surface (Figure 2C). At least 3 distinct viral groups were observed during the field survey but their discrimination was not always possible.

The heterotrophic flagellate abundance as determined with EFM (Figure 2E, F) fluctuated from 0.5×10^1 cells.ml⁻¹ (April, 50 m) to 6.9×10^2 cells.ml⁻¹ (May, 50 m). Heterotrophic flagellates smaller than 5 µm (Figure 2E) which are known to be the main bacterial grazers increased in the epilimnion from March and their maximal abundance was recorded in April at 15 m (2.4×10^2 cells.ml⁻¹). These small flagellates could also present rather high abundances in hypolimnion during June. Peaks for total heterotrophic flagellates abundance in the upper layers (0-15 m) were observed during April (2.4×10^2 cells.ml⁻¹ at 15 m) and at the beginning of May (2.1×10^2 cells.ml⁻¹ at 2 and 15 m) while in the bottom layers (from 30 to 50 m), very low abundances were recorded until the middle of May. Then, a peak of abundance was observed due to the presence of epiphytic flagellates (mainly choanoflagellates) fixed on phytoplanktonic cells, probably corresponding to sedimenting cells. Pigmented flagellates had moderate concentrations during the first two months (Figure 2G), a first increase was observed in the euphotic zone during April (1.1×10^3 cells.ml⁻¹ at 15 m depth) but the significant peak of abundance appeared only in June (4.3×10^3 cells.ml⁻¹ at 2 m depth). From February to June, the abundance of ciliates (Figure 2H) ranged from 3 cells.ml⁻¹ (February, 2 m) to 46 cells.ml⁻¹ (April, 15 m). The highest values were observed during April in the epilimnetic and metalimnetic layers concomitantly with the development of bacteria, picocyanobacteria, and small flagellates. During this spring increase, we observed mainly Oligotrichs, Haptorids, Colpods and some Scuticociliates while Prostomatids constituted a dominant group during the winter period. Oligotrichs were dominant and were mainly represented by *Halteria* and *Strombidium*, which are known to be important bacterial consumers in meso- to eutrophic freshwater systems, with a strong grazing impact on a wide prey size spectrum (JURGENS & SIMEK, 2000 ; KISAND & ZINGEL, 2000 ; SIMEK *et al.*, 2000).

3.2 Relationships between the different microbial groups

There was a positive relationship between viral and heterotrophic bacterial communities ($r=0.51$; $p<0.05$; $n=72$). The higher densities of ciliates in the epilimnion were consistent with the higher densities of resources in these layers (flagellates, small picoeukaryotes and bacteria), and significant correlations were found between the abundance of ciliates and the abundance of heterotrophic bacteria ($r=0.7$; $p<0.05$; $n=24$) and the abundance of pigmented eukaryotes ($r=0.81$; $p<0.05$; $n=24$). No significant correlations were found between the other communities.

3.3 Estimates of the impact of viruses and flagellate protozoa on bacterial mortality.

For the first *in situ* experiment for estimating the impact of viruses and flagellated protozoa on bacteria, the experimental samples were characterized by relatively low abundances of the 4 microbial communities counted by FCM at t0: 2×10^3 , 3×10^3 , 3×10^6 , and 3×10^7 cells.ml⁻¹ for picocyanobacteria, small pigmented eukaryotes, heterotrophic bacteria and viruses respectively. For the second experiment, higher concentrations of picocyanobacteria ($12\text{--}14 \times 10^3$ cells.ml⁻¹), eukaryotes ($12\text{--}14 \times 10^3$ cells. ml⁻¹), viruses ($6\text{--}7 \times 10^7$ part.ml⁻¹) and heterotrophic bacteria (4×10^6 cells.ml⁻¹) were recorded. For the two experiments, we specifically determined the abundance of protozoan grazers in the water filtered through 11 μm . On 30 March, the total abundance of flagellates (pigmented and heterotrophic) in the fraction < 11 μm was 248 cells.ml⁻¹. Heterotrophic flagellates (HF) largely dominated with 230 cells.ml⁻¹. At the beginning of the second experiment (11 May) flagellates abundance was significantly higher, with a total number of 708 cells.ml⁻¹ (heterotrophic + pigmented cells). Once again, heterotrophic flagellates were dominant with abundance reaching 574 cells.ml⁻¹, representing 81% of the total flagellate community. The differences in abundance and structure of the flagellated grazers at the beginning of the 2 experiments suggested that their impact in the epilimnion was different in March and May. From one experiment to the other, we switched from a moderate abundance of flagellates to a rather high abundance. During the first experiment, small flagellates (size 2–4 μm) were dominant, accounting for 84% of the total abundance of heterotrophic flagellates, while in May heterotrophic flagellates were more diversified. Typically, small uniflagellates were largely represented (34% of total HF), but cryptomonad forms such as *Katablepharis* dominated (45% of total HF) and Chrysomonad forms as *Spumella* represented 12% of the total HF abundance.

The results which follow relate to lake water initially taken and filtered through 11 μm and thus containing only viruses, bacteria and flagellates protozoa. Initially, we checked that the dilution with ultra pure water (<100 KDa) yielded a clear gradient in viral concentrations (data not shown). In the 2 dilution experiments conducted on March–April (Exp1) and in May (Exp2), significant relationships were found between the level of dilution and the apparent growth rate of the heterotrophic bacterial community. We estimated the total mortality rates (attributable to both viruses and flagellate protozoa) to be 31% d⁻¹ for Exp1 (Figure 3A) and 42% d⁻¹ for Exp2 (Figure 3B). During the second experiment, by using virus-free diluent (<100 kDa) in the dilution experiments in parallel to the conventional 0.2 μm dilution series, the impact of flagellates and viruses could be separated and was calculated to be equivalent to daily bacterial removal rates of 32% d⁻¹ and 10% d⁻¹ respectively.

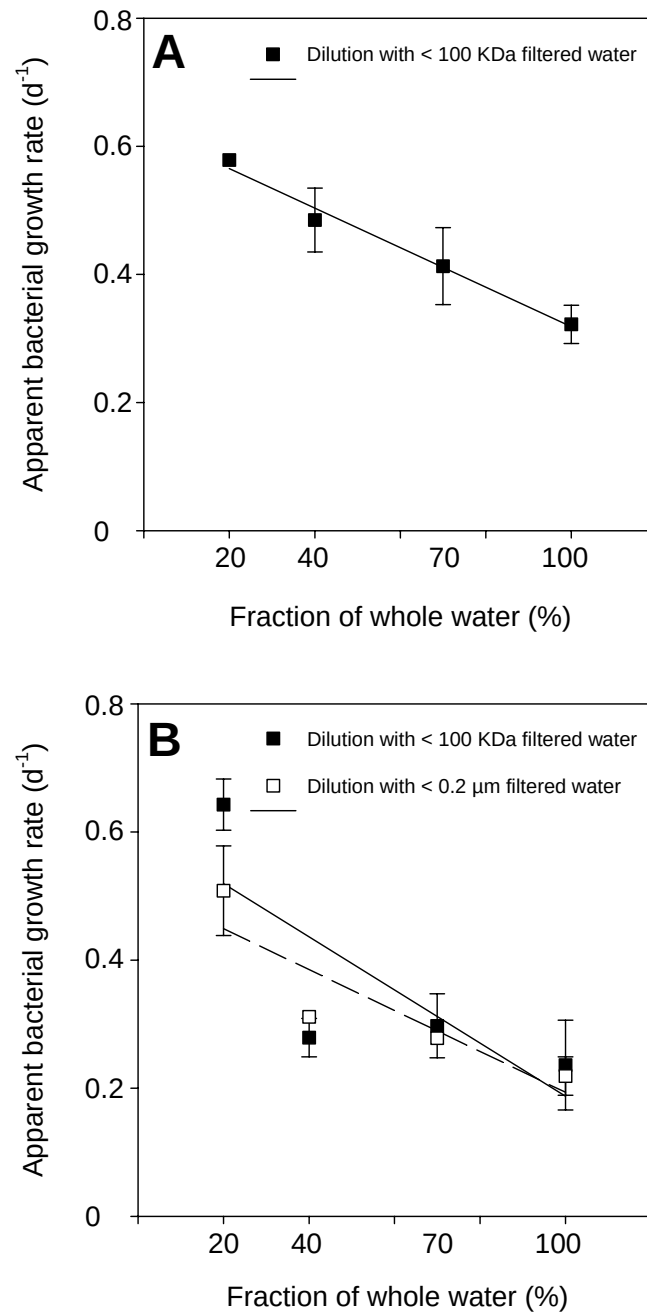


Figure 3: Dilution plots and analysis when < 100 KDa and < 0.2 μm filtered lake water were used to dilute the microbial samples (*i.e.* < 11 μm) during experiment 1 (A) and 2 (B).

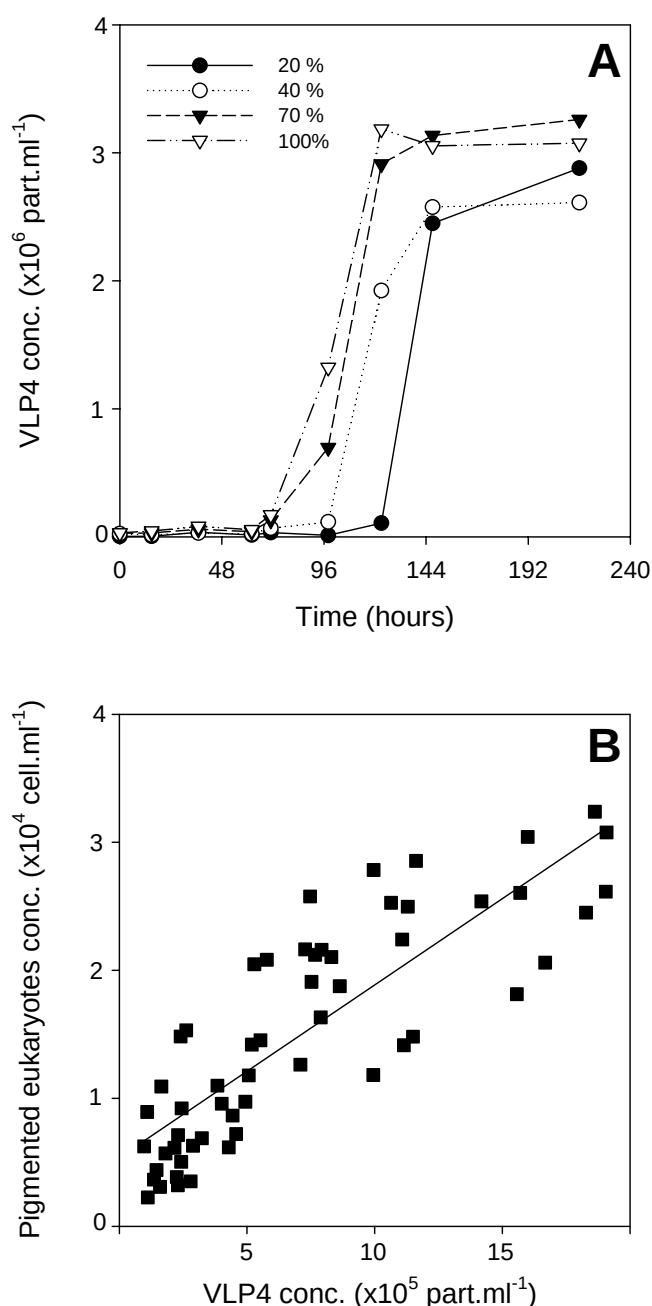


Figure 4: VLP4 population's dynamics during the first experiment (A) and VLP4 concentration against the pigmented eukaryotic community concentration for a dilution series set up with the 0.2 μm and 100 KDa diluents (B).

3.4 VLP4: a particular population of viruses?

The FCM analysis allowed us to observe 4 different populations of viruses (Figure 1C, D), with the onset of a particular viral population named VLP4 for "Virus-Like-Particles group 4" (Figure 1D) distinguished from its typical fluorescence and size characteristics. VLP4 population emerged between the 4th and the 6th day of the first experiment with an increasing concentration from about 3×10^4 part.ml⁻¹ up to 3×10^6 part.ml⁻¹. Then, VLP4 concentration remained quasi-constant until the end of the experience (at the 9th day). This suggests that these viruses have infected their hosts between the 1st and 4th day of the

experiment. During the second *in situ* experiment, we also detected the presence of VLP4. This population was present in considerable concentrations ($> 1 \times 10^6$ part.ml⁻¹ in the undiluted $< 11 \mu\text{m}$ raw samples) from the very start of Exp2. The concentrations of these viral particles were multiplied by 2.2 between the 5th and the last day of the experiment, ranging from 7.5×10^5 to 1.8×10^6 part.ml⁻¹ in the undiluted water fraction, and from 1×10^5 to 1.1×10^6 part.ml⁻¹ in the dilution containing 20% of the raw samples (*i.e.* $< 11 \mu\text{m}$). Although this population was present from the very start of the second experiment, its concentrations did not reach those observed in the first one (1.9×10^6 part.ml⁻¹ in Exp2 vs. 3×10^6 in Exp1). The concentrations of VLP4 were not correlated to those of the prokaryotic community (*i.e.* heterotrophic bacteria or picocyanobacteria) but to those of the small pigmented eukaryotes. The correlations obtained in experimental samples diluted with < 100 kDa and < 0.2 filtered water were both significant ($r_{a/2} = 0.38$, $n=58$, $p < 0.05$). We counted approximately 50 VLP4 by eukaryote.

4. Discussion

No data concerning the dynamics of the whole and main microbial communities, characteristics of the microbial loop of Lake Geneva, have been published to date. In addition, this is the first study dealing with natural aquatic viruses of Lake Geneva, both in terms of dynamics at different periods of the year and of their potential functional role as mortality agents of bacteria. So far, there are still not so many investigations on the seasonal fluctuations in the abundance of these particles in large natural freshwater ecosystems (HENNES & SIMON, 1995 ; TAPPER & HICKS, 1998 ; HOFFER & SOMMARUGA, 2001 ; FISHER & VELMIROV, 2002 ; BETTAREL *et al.*, 2003b ; VREDE *et al.*, 2003 ; BETTAREL *et al.*, 2004). Moreover, predation by protozoa and parasitism by viruses were investigated simultaneously, which have not been realised so often (FUHRMAN & NOBLE, 1995 ; GUIXA-BOIXEREU *et al.*, 1996, 1999 ; WEINBAUER & HOFLE, 1998 ; PEDROS-ALIO *et al.*, 2000 ; ALMEIDA *et al.*, 2001 ; SIMEK *et al.*, 2001 ; BETTAREL *et al.*, 2003a, 2004 ; HORNAK *et al.*, 2005 ; JACQUET *et al.*, 2005).

The dynamics of the microbial communities was comparable to those found in many other freshwater ecosystems in which, after the winter period characterized by relatively weak concentrations of the different groups, there is a traditional spring proliferation between 0 and 20 meters, supported by the increase of temperatures, increase of luminosity and the presence of nutrients in surface waters (WEISSE, 1993 ; CALLIERI & STOCKNER, 2002 ; BETTAREL *et al.*, 2003a). By confronting data altogether, we found a clear and positive relationship between bacterial and viral numbers (especially VLP1, cf. Fig 1C), suggesting that these viruses were mainly bacteriophages (SIME-NGANDO *et al.*, 2003 ; Weinbauer, 2004) and that a tight coupling existed between the two communities in Lake Geneva. However, the succession of the different populations, especially the HNF and the ciliates after the bacterial groups, also strongly suggested that these protists were an important factor in bacterial biomass regulation (JURGENSEN & SIMEK, 2000 ; KISAND & ZINGEL, 2000 ; SIMEK *et al.*, 2000). The importance of the flagellate predation was definitely confirmed with our two *in situ* experiments revealing that these small grazers could be responsible for ~30% of the daily bacterial production removal. The evaluation of clearance rates for each flagellate taxon (using fluorescent micro beads ingestion), allowed us to estimate that the potential flagellate bacterivory in the $< 11 \mu\text{m}$ water sample represented 10% and 43% of daily bacterial removal, respectively in the first and the second experiments. Grazing rates of flagellates were estimated as the product of bacterial concentration, flagellates concentration and assessed clearance rates for each taxon. Although we are aware that short term

measurements done with fluorescent particles (a few minutes) are quite difficult to extrapolate to daily impact, it appeared clearly that the impact of flagellate grazing on bacteria was largely lower during the first experiment compared to the second one. During the experiment realised in May, the estimation of grazing rates using fluorescent microbeads methods could be compared to the result obtained with the dilution method. It appeared that the fluorescent microspheres technique led to the estimation of higher values in terms of flagellates impact on bacteria (43% vs. 32% with the dilution method), but still the range was comparable.

By comparison with the flagellate impact on bacteria, we found that the viral-induced bacterial mortality was lower, as generally reported in the pelagic literature. However, the impact of lysis in Lake Geneva seemed to be in the same range than in the oligotrophic Lake Pavin (6-16%) or in the mesotrophic lake Bourget (9-19%) but definitely lower than in the anoxic layer of the eutrophic Lake Plussee or of the oligotrophic Lake Pavin (up to 97%) as reported by BETTAREL *et al.* (2003, 2004), WEINBAUER & HOFLE (1998) and SIME-NGANDO (personal communication). Thus, viruses were at least responsible for 10% of the daily bacterial removal and we can expect that this impact could be higher at other periods of the year, for example in summer when temperature increases (BETTAREL *et al.*, 2003, 2004). We also estimated viral impact in surface waters only and it is likely that viral-induced bacterial mortality may change with increasing depth (BETTAREL *et al.*, 2003 ; WEINBAUER & HOFLE 1998).

The existence of different viral groups observed with FCM has already been observed in the past but to the best of our knowledge it is the first time that 4 different groups could be detected. This emphasizes once more how powerful a technique like flow cytometry is for the detection, discrimination and precise quantification of the different microbial communities. This is particularly true for the VLP4 population. Although we did not identify this population using transmission electron microscopy and molecular tools, we could propose that this viral group was probably linked to the pigmented eukaryote community. Indeed, during a field experiment in Norwegian coastal waters, JACQUET *et al.* (2002) revealed, on the basis of cytofluorimetric signature, the presence of a viral population which infects the photosynthetic eukaryote *Emiliana huxleyi*. In the same way, BRUSSAARD *et al.* (1999) described the characteristics of the cytofluorimetric signature of a viral population which infected the Prymnesiophyceae *Phaeocystis pouchetii*. Because the viral population VLP4 had exactly the same signature as that observed in those studies relating to phytoplanktonic eukaryotes, we decided to investigate the eukaryotic population in Exp2. According to the significant correlation we found between these two groups, and according to what is said above, it is likely that VLP4 population were viruses infecting one or several of the small pigmented eukaryotes in our samples. Finally, all VLP4 particles passed through 0.45 µm polycarbonate filters and only a negligible fraction through 0.2 µm polycarbonate filters, suggesting that these particles were indeed viruses and not small bacteria. In the future, we will try to isolate this population of viruses for molecular characterisation and for studying their ecological significance in Lake Geneva.

5. Conclusion

We are just beginning the study of the natural viral dynamics and diversity of Lake Geneva and our first results are very promising. Using a modified approach of the dilution approach, we could address the question of the viral vs. protozoan impact on bacteria. This is particularly critical when one knows that this bacterioplankton is one of the most important biological compartments at the basis of the food web, responsible for the recycling of

nutrients and the decomposition of organic matter in the pelagic zone of freshwater ecosystems, and the main food source for pelagic protists. To the best of our knowledge, this dilution technique has only been used a few times (WILHELM *et al.*, 2002 ; EVANS *et al.*, 2003 ; JACQUET *et al.*, 2005). We strongly believe that it will be used more and more in the field of aquatic viral ecology to assess viral impact on various planktonic populations or communities, keeping in mind that this technique may suffer from different drawbacks that we largely discussed in JACQUET *et al.* (2005). Finally, we have shown that flow cytometry can allow rapid observation and discrimination of several viral groups of interest.

Acknowledgements

We are grateful to JC HUSTACHE who helped in water sampling and to A MILLERY and JN AVRILLIER who helped in protist counting. R NOBLE is acknowledged for her critical reading and English correction of a first version of the manuscript.

References

- M.A Almeida, M.A. Cunha, F. Alcantara, Loss of estuarine bacteria by viral infection and predation in microcosm conditions, *Microbial Ecology* 42 (2001) 562-571.
- O. Bergh, K.Y.Borsheim, G. Bratbak, M. Haldal, High abundances of viruses found in aquatic environments, *Nature* 340 (1989) 467-468.
- Y. Bettarel, C. Amblard, T. Sime-NGando, J.F. Carrias, D. Sargos, F. Garabetian, P. Lavandier, Viral lysis, flagellate grazing potential and bacterial production in Lake Pavin, *Microbial Ecology* 45 (2003a) 119-127.
- Y. Bettarel, T. Sime-NGando, C. Amblard, J.F. Carrias, C. Portelli, Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophic, *Freshwater Biology* 48 (2003b) 810 – 822.
- Y. Bettarel, T. Sime-NGando, C. Amblard, J. Dolan, Viral activity in two contrasting lake ecosystems, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 2941-2951.
- G. Børshheim, G. Bratbak, M. Haldal, Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy, *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990) 352-356.
- C.P.D. Brussaard, R. Thyraug, D. Marie, G. Bratbak, Flow cytometric analyses of viral infection in two marine phytoplankton species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae), *Journal of Phycology* 35 (1999) 941-948.
- A. Calbet, M.R. Landry, Phytoplankton growth, microzooplankton grazing, and carbon cycling in marine systems, *Limnology and Oceanography* 49 (2004) 51-57.
- C. Callieri, J.G. Stockner, Freshwater autotrophic picoplankton: a review, *Journal of Limnology* 61 (2002) 1-14.
- L. Campbell, E.J. Carpenter, Estimating the grazing pressure of heterotrophic nanoplankton on *Synechococcus* spp. using the sea water dilution and selective inhibitor techniques, *Marine Ecology Progress Series* 33 (1986) 121-129.
- D.A. Caron, Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedure, *Applied and Environmental Microbiology* 46 (1983) 491-498.
- H.X. Chiura, Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria, *Aquatic Microbial Ecology* 13 (1997) 75-83.
- M.R.J. Clokie, A.D. Millard, W.H. Wilson, N.H. Mann, Encapsidation of host DNA by bacteriophages infecting marine *Synechococcus* strains, *FEMS Microbiology Ecology*

- 46 (2003) 349-352.
- J. Demuth, H. Neve H., K. Witzel, Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in Lake Plusssee, *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993) 3378-3384.
- C. Evans, S.D. Archer, S. Jacquet, W.H. Wilson, Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. Population, *Aquatic Microbial Ecology* 30 (2003) 207-219.
- U.R. Fischer, B. Velimirov, High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake, *Aquatic Microbial Ecology* 27 (2002) 1-12.
- J.A. Fuhrman, Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects, *Nature* 399 (1999) 541-548.
- J.A. Fuhrman, R.T. Noble, Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater, *Limnology and Oceanography* 40 (1995) 1236-1242.
- N. Guixa-Boixereu, D. Vaqué, J.M. Gasol, J.M. Sanchez-Camara, C. Pedros-Alio, Viral distribution and activity in Antarctic waters, *Deep-Sea Research II* 49 (2002) 827-845.
- K.P. Hennes, M. Simon, Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake, *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995) 333-340.
- J.S. Hofer, R. Sommaruga, Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: importance of filamentous forms, *Aquatic Microbial Ecology* 26 (2001) 1-11.
- K. Hornak, M. Masin, J. Jezbera, Y. Bettarel, J. Nedoma, T. Sime-Ngando, K. Simeck, Effects of decreased resource availability, protozoan grazing and viral impact on a structure of bacterioplankton assemblage in a canyon-shaped reservoir. *FESM Microbiology Ecology* 52 (2005) 315-327.
- S. Jacquet, I. Domaizon, S. Personnic, S. Duhamel, A.S. Pradeep Ram, M. Heldal, T. Sime-Ngando, Estimates of viral-induced vs. protozoan-induced bacterial mortality in Lake Bourget, France, *Freshwater Biology* 50 (2005) 627-645.
- S. Jacquet, M. Heldal, D. Iglesias-Rodriguez, A. Larsen, W. Wilson, G. Bratbak, Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection, *Aquatic Microbial Ecology* 27 (2002) 111-124.
- S.C. Jiang, J.H. Paul, Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment, *Marine Ecology Progress Series* 104 (1994) 163-172.
- K. Jürgens, K. Simek, Functional response and particle size selection of *Halteria cf. grandinella*, a common freshwater oligotrichous ciliate, *Aquatic Microbial Ecology* 22 (2000) 57-68.
- V. Kisand, P. Zingel, Dominance of ciliate grazing on bacteria during spring in a shallow eutrophic lake, *Aquatic Microbial Ecology* 22 (2000) 135-142.
- M.E. Klut, J.G. Stockner, Virus-like particles in an ultraoligotrophic lake on Vancouver Island, British Columbia, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47 (1990) 725-732.
- M.R. Landry, B.C. Monger, K.E. Selph, Time-dependency of microzooplankton grazing and phytoplankton growth in the subarctic Pacific, *Progress in Oceanography* 32 (1993) 205-222.
- M.R. Landry, R.P. Hassett, Estimating the grazing impact of marine microzooplankton, *Marine Biology* 67 (1982) 283-288.
- M.R. Landry, J. Kirshtein, J. Constantinou, A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific, *Marine Ecology Progress Series* 120 (1995) 53-63.
- P. Lebaron, P. Servais, H. Agogue, C. Courties, F. Joux, Does the high nucleic acid content of

- individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems?, *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 1775-1782.
- W.K.W. Li, J. F. Jellet, P. M. Dickie, DNA distributions in marine bacteria stained with TOTO or TO-PRO, *Limnology and Oceanography* 40 (1995) 1485-1495.
- W.K.W. Li, Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters, *Limnology and Oceanography* 43 (1998) 1746-1753.
- R. Maranger, D.F. Bird, Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters, *Marine Ecology Progress Series* 121 (1995) 217-226.
- R. Maranger, D.F. Bird, S.K. Juniper, Viral and bacterial dynamics in Arctic sea ice during the spring algal bloom, near Resolute, NWT, Canada, *Marine Ecology Progress Series* 111 (1994) 121-127.
- D. Marie, D. Vaultot, F. Partensky, Application of the novel Nucleic-acid stains YOYO-1, YO-PRO-1 and PicoGreen for flow cytometric analyses of marine prokaryotes, *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1996) 1649-1655.
- D. Marie, C.P.D. Brussaard, R. Thyraug, G. Bratbak, D. Vaultot, (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 45-52.
- J.H. Paul, J.B. Rose, S.C. Jiang, C.A. Kellogg, L. Dickson, Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida, *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993) 718-724.
- J.H. Paul, S.C. Jiang, J.B. Rose, Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (1991) 2197-2204.
- C. Pédro-Alío, J. I. Caldéron-Paz, J. M. Gasol, Comparative analysis show that bacterivory, not viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton, *FEMS Microbiology Ecology* 32 (2000) 157-165.
- L.M. Proctor, J.A. Fuhrman, Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria, *Nature* 343 (1990) 60-62.
- B.R. Robertson, D.K. Button, Characterizing aquatic bacteria according to population cell size, and apparent DNA content by flow cytometry, *Cytometry* 10 (1989) 70-76.
- P. Servais, E.O. Casamayor, C. Courties, P. Catala, N. Parthuisot, P. Lebaron, Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquatic Microbial Ecology* 33 (2003) 41-51.
- T. Sime-Ngando, Y. Bettarel, C. Chartogne, K. Sean, The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology, *Recent Research Development in Microbiology* 7 (2003) 481-497.
- T. Sime-Ngando, G. Bourdier, C. Amblard, B. Pinel-Alloul, Short-term variations in specific biovolumes of different bacterial forms in aquatic ecosystems, *Microbial Ecology* 21 (1991) 211-226.
- K. Simek, K. Jürgens, J. Nedoma, M. Comerma, J. Armengol, Ecological role and bacterial grazing of *Halteria* sp: small freshwater oligotrichs as dominant pelagic ciliate bacterivores, *Aquatic Microbial Ecology* 22 (2000) 43-56.
- K. Simek, 7 co-authors, Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir, *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 2723-2733.
- C.A. Suttle, The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities, *Microbial Ecology* 28 (1994) 237-243.
- C.A. Suttle, A.M. Chan, M.T. Cottrell, Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity, *Nature* 347 (1990) 467-469.

- C.A. Suttle, F. Chen, Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater, *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992) 3721-3729.
- M.A. Tapper, R.E. Hicks, Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton, *Limnology and Oceanography* 43 (1998) 95-103.
- F. Torella, R. Morita, Evidence by electron micrographs for a incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, *Applied and Environmental Microbiology* 37 (1979) 774-778.
- K. Vrede, U. Stensdotter, E.S. Lindström, Viral and bacterioplankton dynamics in two lakes with different humic contents, *Microbial Ecology* 46 (2003) 406-415
- M.G. Weinbauer, Ecology of prokaryotic viruses, *FEMS Microbiology Reviews* 28 (2004) 127-260.
- M.G. Weinbauer, M.G. Höfle, Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake, *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998) 431-438.
- M.G. Weinbauer, F. Rassoulzadegan, Are viruses driving microbial diversification and diversity?, *Environmental Microbiology* 6 (2004) 1-11.
- T. Weisse, U. Scheffel-Möser, Growth and grazing loss rates in single-celled *Phaeocystis* sp. (Prymnesiophyceae), *Marine Biology* 106 (1990) 153-158.
- T. Weisse, Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems, *Advances in Microbial Ecology* 13 (1993) 327-370.
- P.A. White, J. Kalff, J.B. Rasmussen, J.M. Gasol, The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats, *Microbial Ecology* 21 (1991) 99-118.
- S.W. Wilhelm, S.M. Brigden, C.A. Suttle, A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters, *Microbial Ecology* 43 (2002) 168-173.
- K.E. Wommack, R.R. Colwell, Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (2000) 69-114.

Seasonal variations of virus- vs. flagellate-induced mortality of picoplankton in three peri-alpine lakes

Microbial Ecology (soumis)

Sébastien PERSONNIC¹, Isabelle DOMAIZON², Stéphan JACQUET^{1*}

1 *UMR CARTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie
Lacustre, 74203 Thonon cedex, France*

2 *UMR CARTEL, Equipe de Microbiologie Aquatique, Université de Savoie, 73376 Le
Bourget-du-Lac cedex, France*

* To whom correspondence should be addressed

personnic@thonon.inra.fr ; Tel: +33.4.50.26.78.12 ; Fax : +33.4.50.26.07.60

Keywords: viruses, bacteria, picocyanobacteria, flow cytometry, lake, trophic status, dilution, viral lysis, grazing.

Abstract

Viruses and small flagellated protozoan are known to exert an important control on picoplanktonic populations. In parallel to the study of virioplankton, bacterioplankton, picocyanobacteria, heterotrophic flagellates and ciliates dynamics in surface waters (0-50 m) of Lakes Geneva, Bourget and Annecy and the statistical analysis of relationships between these different microorganisms and their environment, we investigated the impact of viruses and heterotrophic flagellates on picoplanktonic communities. In that goal, a dilution approach was used at different seasonal periods in order to assess flagellate- vs. virus-induced mortality of heterotrophic bacteria, picocyanobacteria and small eukaryotic phytoplankton. Most of the time, it was not possible to detect a clear viral effect, typically in winter. In summer, however, viral lysis and protozoan grazing could be responsible for up to 71% of the bacterial mortality. Viral impact, considered alone, never equals or exceeds predation and no synergistically effects between viruses and grazers could be detected when considering heterotrophic bacterial removal. For picocyanobacteria, however, viral lysis could exceed the impact of the grazers (in autumn typically). In addition, a synergy of actions between parasites and predators could be observed at this occasion. The temporal variations observed for potential viral parasitism and flagellate predation were consistent with the *in situ* dynamics and statistical relationships found between communities. This study provides a new evidence of the critical role played by viruses and small flagellates in the functioning of the microbial food webs and highlights the importance to consider further these biological compartments for a better understanding of freshwater plankton ecology, typically in large peri-alpine lakes where microbial (viral) ecology has been poorly investigated so far.

Introduction

During the last two decades, a significant amount of results has revealed that viruses may control bacterial and phytoplankton abundance through high lytic activities in both marine and limnetic environments. Viral lysis may be responsible for 10-60% of daily bacterial production removal, reviewed in [35, 78], while such a percentage can reach 100% in microalgal bloom situations [13, 36]. Whatever the importance of these parasites in killing bacterial hosts, a process which may vary considerably with time [56], space [59] and host presence and activity [53], viruses have also been shown to play a key role in modifying and sustaining bacterial diversity. Such a role of aquatic viruses as controlling agents of diversity has been proposed through at least two possible mechanisms: the “killing the winner” hypothesis where viruses kill the dominant host species so that the clonal diversity of host communities is favored or differently said by allowing less-dominant competitors to proliferate [11, 72, 73] and/or through genetic transmission referred to as transduction [38, 46]. By comparison, such mechanisms have not been investigated yet in eukaryotic phytoplankton [14].

Viruses have different life strategies in order to survive, multiply and spread. In their lytic way of life, viruses enter cells, use the host metabolism to replicate, and lyse the organism in order to be disseminated into the surrounding water. As pointed out by Weinbauer [78], this strategy is likely the predominant used by prokaryotic viruses in aquatic environments. Lysogeny is a second way of living, which consists in an integrated phase of the virus (entirely or not) in the host genome which provides protection to the parasite. When favorable conditions are met (sensed by the virus through host metabolism), viruses can integrate *de novo* the lytic cycle process [1, 83]. The last possibility is the chronic infection, in which one mature and replicated virus does not lyse the bacterial membrane but diffuses through the cell coat. This life strategy might be rare or very difficult to approach since, to the best of our knowledge, it has been suggested only once in an aquatic environment [34].

The different viral life cycles and the real impact of viruses on bacteria and phytoplankton remain complex to study especially when one knows that they are likely to vary dramatically within short-term time and spatial scales. There are still only a few data available on the dynamics of viral communities and their potential hosts in aquatic ecosystems, especially in freshwaters [8, 24, 30, 56]. Available data have generally revealed a tight coupling existing between viruses and bacteria suggesting a close relationship between these 2 communities [12, 47, 63, 78, 80] while such a relationship between viruses and the phytoplankton is rarer or only when bloom situations occur [13, 36]. At last, the impact of viruses as mortality agents remains to be studied for a large variety of ecosystems such as those presented in this study.

Heterotrophic nanoflagellates have been recognised for quite a long time as main consumers of suspended or attached bacteria [9, 26, 58] and of picophytoplankton [16, 32, 60] in a variety of aquatic systems. Recently, Pernthaler [55] reminded that the interplay between viruses and flagellates in the control of aquatic prokaryotes is still poorly understood, with, on one hand, evidences that viral infection and lysis may be favoured by intense protozoan grazing [62, 79] while, in another hand, protists can be the targets for viral attack [28] or significant feeders of viruses [7, 31].

In order to assess the impact of both viruses and flagellated predators on picoplanktonic (including mainly bacteria and picocyanobacteria) mortality of lakes Annecy, Bourget and Geneva, we performed 14 *in situ* experiments at different seasons of the year. Microcosms were used and incubated *in situ* with a series of dilutions of <11 µm raw water for 48 hours. Such an approach was initially introduced by Landry & Hassett [40] and refined by Landry *et al.* [41] in order to quantify grazing of phytoplankton by microzooplankton.

Evans *et al.* [25] followed by Jacquet *et al* [35] proposed some modifications of this approach and could estimate viral lysis on small eukaryotes (*i.e.* *Micromonas*) and heterotrophic bacteria, respectively, in either costal marine waters or in a lake but only at restricted periods of the year. Our aim was to test if the method could be used at any time of the year and could provide reliable data for assessing virus-induced mortality of different communities, *i.e.* bacteria, picocyanobacteria and small eukaryotes, compared to flagellated protozoan predation.

Methods

Study site

Lake Geneva is located on the border between France and Switzerland. It is the largest natural western European lake situated at an altitude of 372 m, with an area of 582 km², a maximum width and length of 13 and 72 km respectively, and a volume of appr. 86x10⁹ m³. Lake Bourget is the largest natural French lake, located in the Eastern part of France (Department of Savoie), at an altitude of 232 m, with an area of 44.2 km², a maximum width and length of 3.5 and 18 km respectively, and a volume of 3.6x10⁹ m³. Lake Annecy, also located in the eastern part of France (Department of Haute-Savoie) is the second largest entirely French lake with an area of 28 km², a width of 3.2 km, a length of 14.6 km, and a volume of 1.2x10⁹ m³, at an altitude of 447 m. All these lakes are of glacial origin and situated in a same eco-region. Following restoration programs, Lake Geneva and Bourget have been reported to be mesotrophic in recent years with total phosphorus concentrations about 25-30 µgP.L⁻¹. By contrast, Lake Annecy has been reported to be oligotrophic since the late 1960s with total phosphorus concentrations lower than 8 µgP.L⁻¹. More details can be found in [5, 23, 35].

Flow cytometry (FCM) sample analysis

Viruses, heterotrophic bacteria, picocyanobacteria, and small eukaryotic phytoplankton were counted using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488 nm and its original filter set-up. Heterotrophic bacterial and viral counts were obtained on fixed samples using glutaraldehyde (0.5% final concentration) for 30 minutes, then diluted in either 0.02 µm filtered fresh water (for the bacteria) or 0.02 µm filtered TE buffer (0.1 mM Tris-HCL and 1 mM EDTA, pH 8) for the viruses. Heterotrophic bacteria were then incubated with SYBR Green I (at a final 10⁻⁴ dilution of the commercial stock solution, Molecular probes) for 15 min. Viruses were incubated with SYBR Green I (5x10⁻⁵ final dilution), for 5 min at ambient temperature, followed by 10 min at 75°C and again 5 min at room temperature, prior to FCM analysis (Dorigo *et al.* in revision). For photosynthetic cells (*i.e.* the picocyanobacteria and small eukaryotes), neither fixative nor fluorochrome were used. Analysis was made on fresh samples in which we added a suspension of 1-µm beads (Molecular probes). FCM listmode files were then analyzed on a PC using CYTOWIN [74].

Epifluorescence microscopy (EFM) sample analysis

Glutaraldehyde (1% final concentration) was used to fix the flagellates. Samples were filtered (pressure < 100 mm Hg) on polycarbonate membranes (diameter: 25 mm, pore size: 0.8 µm), then stained with primulin (modified from [17]) and stored less than one week at -20°C until analysis. Slides were examined under UV light to count the heterotrophic nanoflagellates. Ciliates were preserved with mercuric bichloride (2.5%) and counted according to Sime-Ngando *et al.* [64]. The sedimentation of samples was done during 48h in

an Uthermol column, and the observation was realized with an inverted microscope at a 1,250x magnification.

Dynamics of microbial communities and environmental parameters

In situ microbial community dynamics (*i.e.* viruses, heterotrophic bacteria, picocyanobacteria, small autotrophic eukaryotes) were assessed using FCM while heterotrophic flagellates and ciliates were identified and counted using EFM. Microbial counts were performed on samples taken at the reference station, located in the middle and deepest part of each lake, every two weeks between January 2005 and November 2006 and at seven different depths between 0 and 50 m. Water temperature and transparency, nitrogen and phosphorus forms concentrations were obtained on the same sampling occasions. Water temperature was obtained with a conductivity-temperature-depth measuring device (CTD SBE 19 Seacat profiler, SEABIRD). Water transparency was measured using a Secchi disk. Nutrient concentrations (total Phosphorus, P-PO₄, N-NO₃, N-NH₄ and Si-SiO₂) were measured at UMR CARTEL according to AFNOR protocols.

Experimental set-up for estimating picoplanktonic mortality

We performed fourteen dilution experiments (following Evans *et al.* [25]) from autumn 2005 to summer 2006 in the three peri-alpine lakes presented above. The first experiments, in 2005, were conducted at the end of September (28-30) for Lake Geneva and at the beginning of October for Lake Bourget (04-06) and Annecy (12-14). In winter, dilution experiments were started on the 18th, 25th, 31st of January in Lake Geneva, Bourget and Annecy respectively. Two experiments were conducted in spring (noted A and B), in March (21-23) and in May (10-12) for Lake Geneva, in April (05-07) and in May (17-19) for Lake Annecy, and in April (11-13) for Lake Bourget. Summer experiments were conducted in July for Lake Geneva (19-21) and for Lake Bourget (27-29) while it was in August for Lake Annecy (01-03). Thus, all experiments were conducted at distinct periods of the year in terms of microbial planktonic dynamics and diversity in surface waters of these ecosystems (*e.g.* Comte *et al.* [20], Duhamel *et al.* [24], Jacquet *et al.* [35], Personnic *et al.* in revision, Domaizon *et al.* unpublished). For each experiment, an integrated >15 L sample was taken in the 0-10 m surface layer of the reference station of each lake using a pump and a long flexible pipe controlled from the surface on the boat via an electric cable and a 12-V battery. We took into account the dead volume of the tube that was about 15 L. Back to the laboratory, water sample was first filtered through 20 and then 11 µm mesh filters (NYCOM, Buisine, France) to eliminate the metazooplankton and the ciliates. Then, this water was filtered through 2 µm twice to eliminate all predators and 0.2 µm filters (Nuclepore, Whatman) to eliminate the bacterioplankton. The efficiency of each filtration step, *i.e.* for the absence of either the ciliates or the flagellates or the picoplankton, was tested, at both the beginning and the end of the experiments (not shown). Finally, the fraction of the 0.2 µm-filtered water was subjected to tangential ultra-filtration using a mini-Ultrasette with a 30 Kda cut-off membrane (Vivaflow, Vivasciences) in order to eliminate all organisms and obtain virus-free water. The two diluents, *i.e.* the water without predators (filtered through 0.2 µm) and the water without predators and viruses (filtered through 30 KDa) were mixed with the sample filtered through 11 µm, in order to obtain dilution percentages of the initial (11-µm filtered) water of ca 20, 40, and 70%. Two extra bottles containing 100% of each diluent were also added to the experimental design in order to confirm and follow the absence of contamination. Each treatment was conducted in duplicates. Fig. 1 shows the quality of the dilutions obtained for all experiments mixed together. Note that the size fractionation used for grazers (<11 µm) was chosen according to previous studies in these lakes [20, 23, 24] where it was shown that the

majority of the heterotrophic flagellates were in the 5-11 μm size range and abundant all along the year. Raw and diluted samples were prepared in 500 mL polycarbonate bottles (Nalgene, Bioblock) acid-washed, rinsed 3 times with MilliQ water and autoclaved. Once filled, bottles were incubated at a depth of 1 meter in Lake Geneva. Samples were taken at T0, T24 and T48 hours for subsequent analysis using FCM and at T0 and T48 hours for EFM (see below).

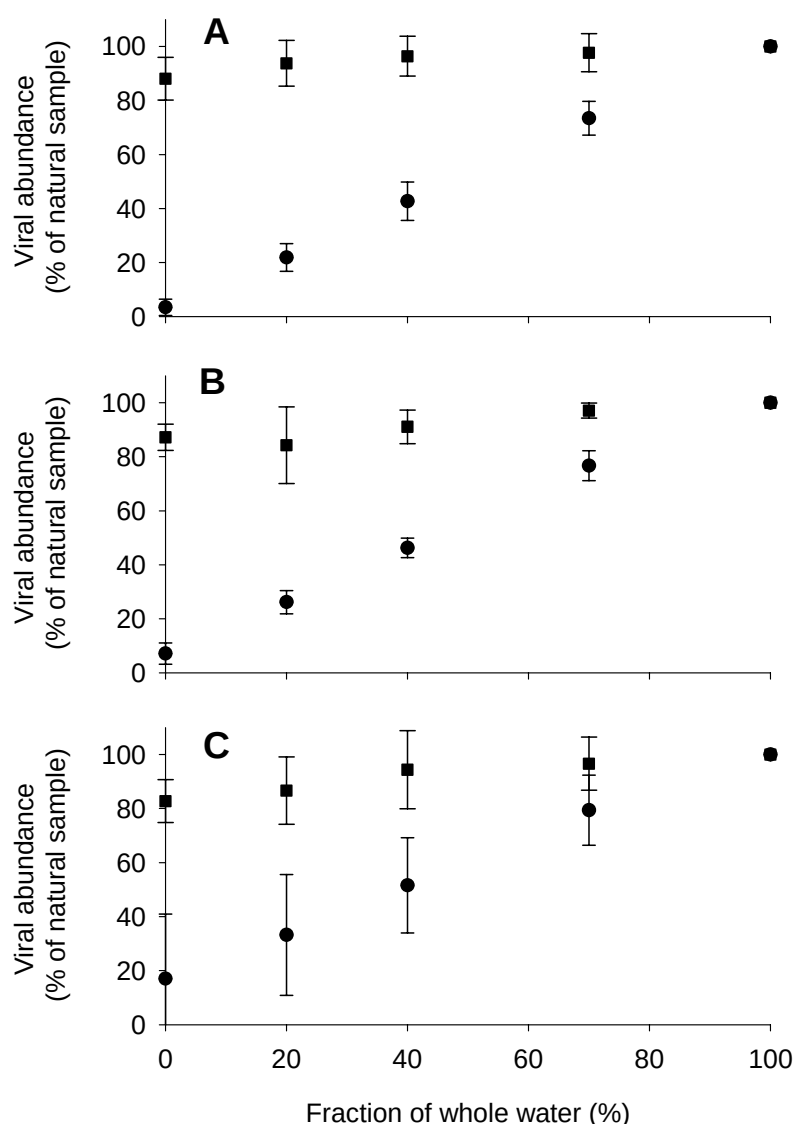


Figure 1. Viral abundance percentage in the different fractions of diluted water with the virus+grazer free diluent (●) or the grazer free diluent (■) in Lakes Geneva (A), Bourget (B) and Annecy (C). The values correspond to the mean and deviation standard values obtained of the 14 experiments (N=8 for Lake Bourget, N=10 for Lake Geneva and Annecy).

Statistical analyses on data of *in situ* monitorings

Data from *in situ* monitorings were subjected to one-way analysis of variance (the absence of replicates for variables preventing the use of two-way ANOVA) to test for effects of time or depth (SigmaStat 3.1). In addition, a matrix of data was produced for non linear redundancy analysis based on polynomial regression [45]. The Freeware (available at <http://www.bio.umontreal.ca/casgrain/en/labo/plrdacca.html>) allowed us to build data tables with explanatory and response variables which allowed to identify combinations of variables

that account for the largest amounts of the total variance observed and how the different variables match all together. Response variables (heterotrophic bacteria and picocyanobacteria) were related to physical (temperature), chemical (P-PO₄, N-NH₄, N-NO₃, SiO₂) and biological (heterotrophic flagellates, ciliates, VLP1, VLP2) explanatory variables. This analysis was conducted on the integrated epilimnion data of the three lakes between January 2005 and October 2006. The program produced the output required to draw biplot diagrams as shown in Fig. 5.

Analysis of data from the dilution experiments

Net growth rate is considered to be a product of the instantaneous growth and the mortality due to grazing and viral lysis. It is assumed that the net growth rate remains constant with respect to the level of dilution whilst mortality is considered to be density dependant [25]. In each experiment, the net growth rate was calculated between T0 and T24 hours and T0 and T48 hours. Then, it was reported graphically as a function of the dilution. The slope between the dilution and the net growth rate gives the percentage of mortality due to grazing (diluant 0.2 µm) or grazing plus lysis (diluant 0.02µm) following the following equation [70]: % of mortality = (1-EXP(Slope))x100. All coefficients of correlation were statistically tested with a linear regression test (Tables 1 and 2, p<0.1) in order to know if the slope value could be used. As the incubation time should correspond to the growth rate of the cell host to obtain a correct estimate of virus-induced cell mortality, we reported the percentage of heterotrophic bacterial mortality per day (Table 1) due to predators with or without the viruses, calculated with bacterial net growth rate between T0 and T24 hours (in summer) and between T0 and T48 hours (in autumn, winter and spring). Table 2 summarizes the percentage of picocyanobacterial mortality, calculated with net growth between T0 and T24 hours in spring (B) and summer experiments while it was between T0 and T48 hours in autumn and winter. At the beginning of spring (A experiment), picocyanobacterial mortality was calculated between T0 and T24 hours in Lake Bourget and between T0 and T48 hours in Lake Geneva and Annecy (see Discussion).

Results

Physico-chemical characteristics

Patterns recorded for temperature were almost similar in the three lakes. Water temperature changes were typical of temperate lakes, with stratification starting in spring and finishing in autumn (Fig. 2A-C). During winter, the temperature was homogeneous throughout the 0-50 m water column. Seasonal thermal stratification was more pronounced in the top 10 m layer with temperature ranging from 7.3°C to 25°C between May and November, and from 4.2°C to 11.8°C between December and April.

P-PO₄, N-NO₃ and SiO₂ decreased all along the stratification period and increased in fall (Fig. 2B-L). N-NH₄ was undetectable in the mesotrophic lakes Bourget and Geneva between winter and spring, but it increased markedly in the top 20 meters during a few days in summer (Fig. 2G-H). P-PO₄, N-NH₄ and N-NO₃ were undetectable in the oligotrophic lake Annecy throughout the 0-50 m water column (Fig. 2F, I, L) while SiO₂ concentrations were largely dominant (Fig. 2M-O).

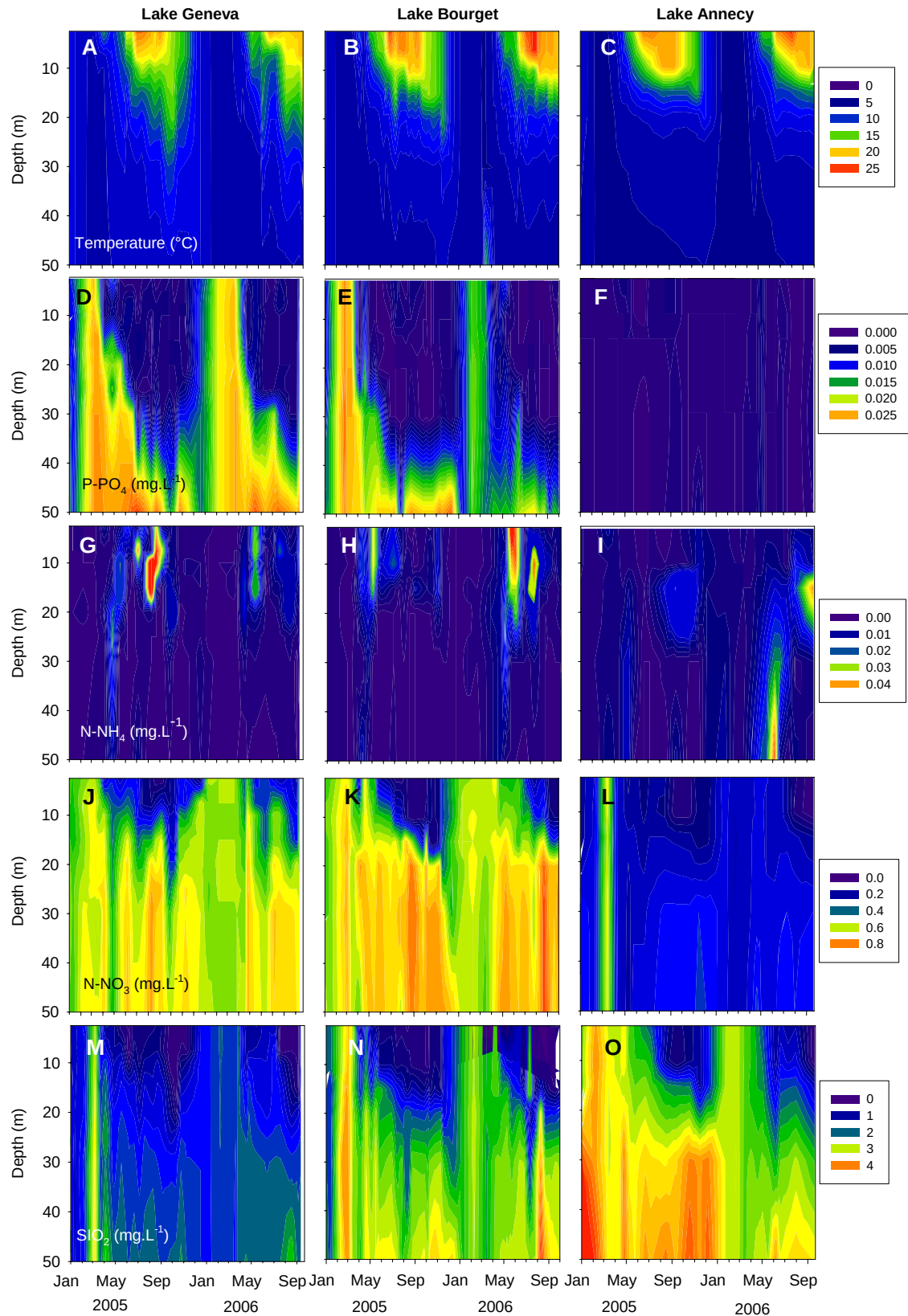


Figure 2. Time series of temperature (°C) and concentrations (mg.L⁻¹) of P-PO₄, N-NH₄, N-NO₃ and SiO₂ obtained between 0 and 50 m in 2005-2006 for Lakes Geneva, Bourget and Annecy.

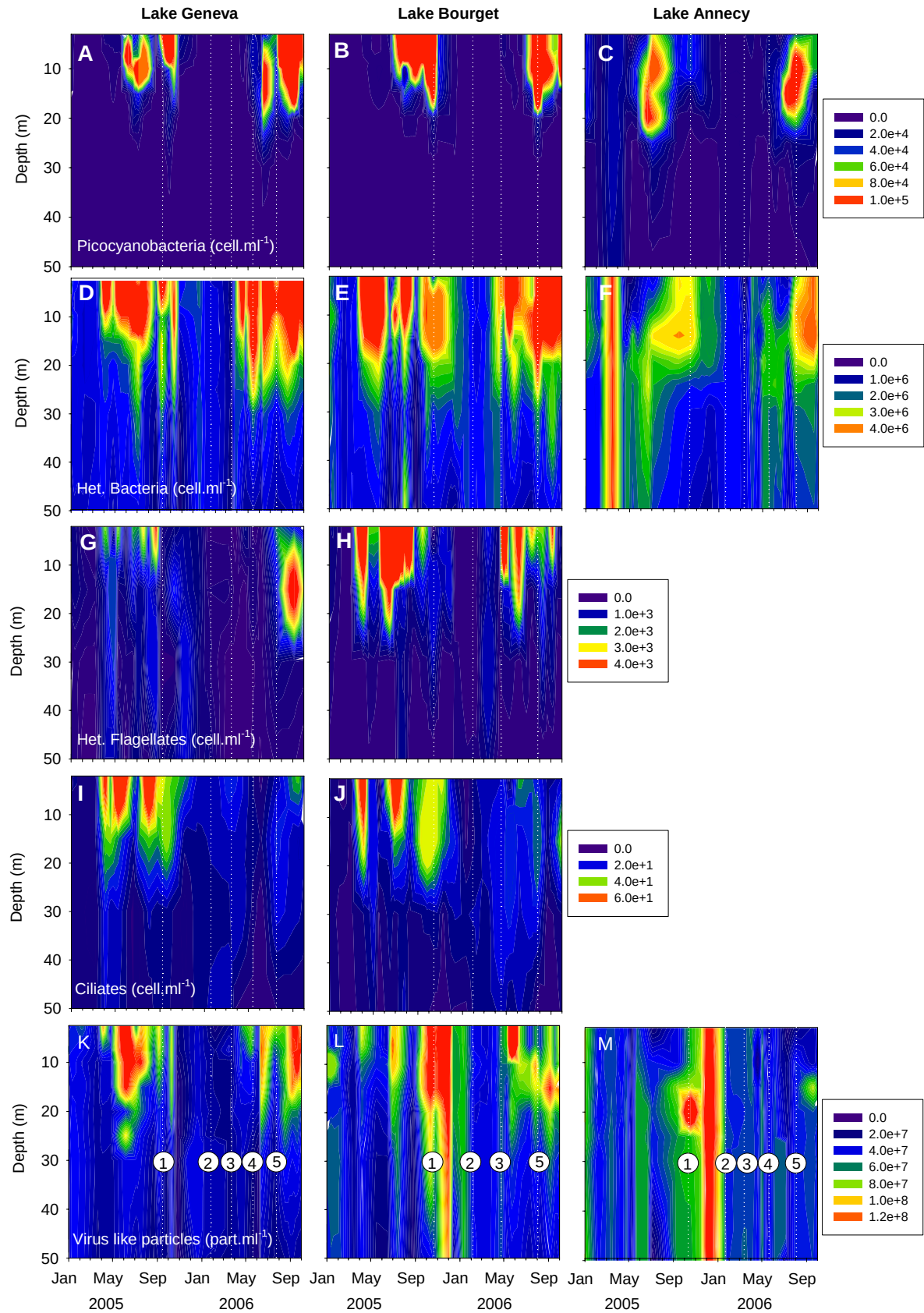


Figure 3. Time series of picocyanobacterial, heterotrophic bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates and virus-like particles distribution obtained between 0 and 50 m in 2005-2006 for Lakes Geneva, Bourget and Annecy. No protozoan data were available for Lake Annecy. The

sampling periods corresponding to the dilution experiments have been symbolized by a dashed line and a serial number.

Microbial communities' dynamics

Picocyanobacterial (*i.e.* PE-rich *Synechococcus* spp.) seasonal distribution was found to be very similar for the three lakes (Fig. 3A-C). Their abundance increased and remained relatively constant during summer months between the surface and 20 m depth. Annual mean and maximal values of the picocyanobacteria were 2.4 and 59.4, 2.8 and 34.2, 4.9 and 14.7×10^4 cells.mL⁻¹ in Lakes Geneva, Bourget and Annecy, respectively.

The heterotrophic bacterial distribution displayed 3 main periods of high bacterial densities in spring, summer and autumn both in lakes Geneva and Bourget (Fig. 3D-E). In Lake Annecy (Fig. 3F), the bacterial seasonal pattern was different and did not present a high density in spring. In Lake Bourget, mean values of heterotrophic bacterial abundances were always higher in autumn (3.3×10^6 cells.mL⁻¹), winter (1.6×10^6 cells.mL⁻¹) and spring (3.2×10^6 cells.mL⁻¹) than in the two other lakes. In summer, mean values became higher in Lake Geneva (3.1×10^6 cells.mL⁻¹). In Lake Annecy, heterotrophic bacterial concentration ranged between 3.1×10^5 and 5.1×10^6 cells.mL⁻¹. Maximal concentrations recorded in Lakes Annecy, Bourget and Geneva were 5.1, 10.8 and 9.9×10^6 cells.mL⁻¹, respectively.

Heterotrophic flagellates were more abundant in Lake Bourget than in Lake Geneva with annual mean abundances of 1.1×10^3 cells.mL⁻¹ and 7.2×10^2 cells.mL⁻¹, respectively. This community reached its highest values from April to September between 0 and 20 m in Lake Bourget (Fig. 3H). In Lake Geneva, the heterotrophic flagellates were more abundant between 0 and 15 m in 2005 and the highest concentrations spread from July to September 2006 (Fig. 3G). No data were available for Lake Annecy.

When considering the ciliate community, a similar pattern could be observed for the two mesotrophic lakes where the highest concentrations were observed in the top 20 meters between April and October 2005 while they did not really increase over the year 2006 (Fig. 3I-J). No data were available for Lake Annecy.

Viruses displayed very comparable patterns in the two mesotrophic Lakes. There were two main periods of high densities in summer and autumn (Fig. 3K-L). In Lakes Geneva and Bourget, virus concentrations ranged from 1.1×10^7 to 1.9×10^8 part.mL⁻¹ and from 1.1×10^7 to 1.2×10^8 part.mL⁻¹, respectively. Maximal concentrations were recorded in the top 20 m in summer. It is noteworthy here that in November, the viral peak of abundance lasted longer than the one of bacteria and was also recorded deeper in Lake Bourget. In Lake Annecy, there was no real peak of abundances in summer but a high density spot was always observed between 15 and 25 meters in September and October.

Two majors groups of viruses could be distinguished using FCM, especially in the top 10 meters. The first group, *i.e.* the one with the lowest green fluorescence (data not shown) was referred to as VLP1 (Virus-like particles group 1). It is assumed that this group, which represented >90% of the total viral community, is composed mainly with bacteriophages [18, 19, 24, 30, 36, 42, 44, 48]. In Lakes Geneva, Bourget and Annecy, the VLP1 mean abundances in the top 10 m were 6.9×10^7 , 7.4×10^7 and 4.4×10^7 part.mL⁻¹, respectively (Fig. 4A-C). The second group, labeled VLP2 and characterized with a higher green fluorescence signature, represented <7% of the total viral community, and may be typical of cyanophages [18, 57, Personnic *et al.* in revision]. These VLP2 reached annual mean abundances in the top 10 m of 5.7, 4.7 and 2.8×10^6 part.mL⁻¹ in Lakes Geneva, Bourget and Annecy, respectively (Fig. 4 G-I). With the goal to interpret VLP1 variations in parallel to the bacterial evolution, we followed the virus (VLP1) to bacteria ratio (VBR), from January 2005 to September 2006 (Fig. 4D-F). The lowest VBR was recorded in spring for the three

lakes. In Lakes Geneva and Bourget, the first increase of viral abundance over the year was observed in May whereas bacteria bloomed at the beginning of April. Minimal/maximal values of the VBR were 8.6 /37.6 for Lake Geneva, 5.9/69.1 for Lake Bourget and 6.8/114.2 for Lake Annecy. Strong amplitudes of variations for the VBR were recorded in Lake Annecy, followed by Lake Bourget while VBR appeared relatively stable in Lake Geneva (Fig. 4D-F). We also interested in the VCR (*i.e.* the ratio of VLP2 on picocyanobacteria). In Lake Annecy, the VCR was relatively constant with only small variations. In contrast, a strong peak of VCR could be reported between November and May in both Lakes Bourget and Geneva.

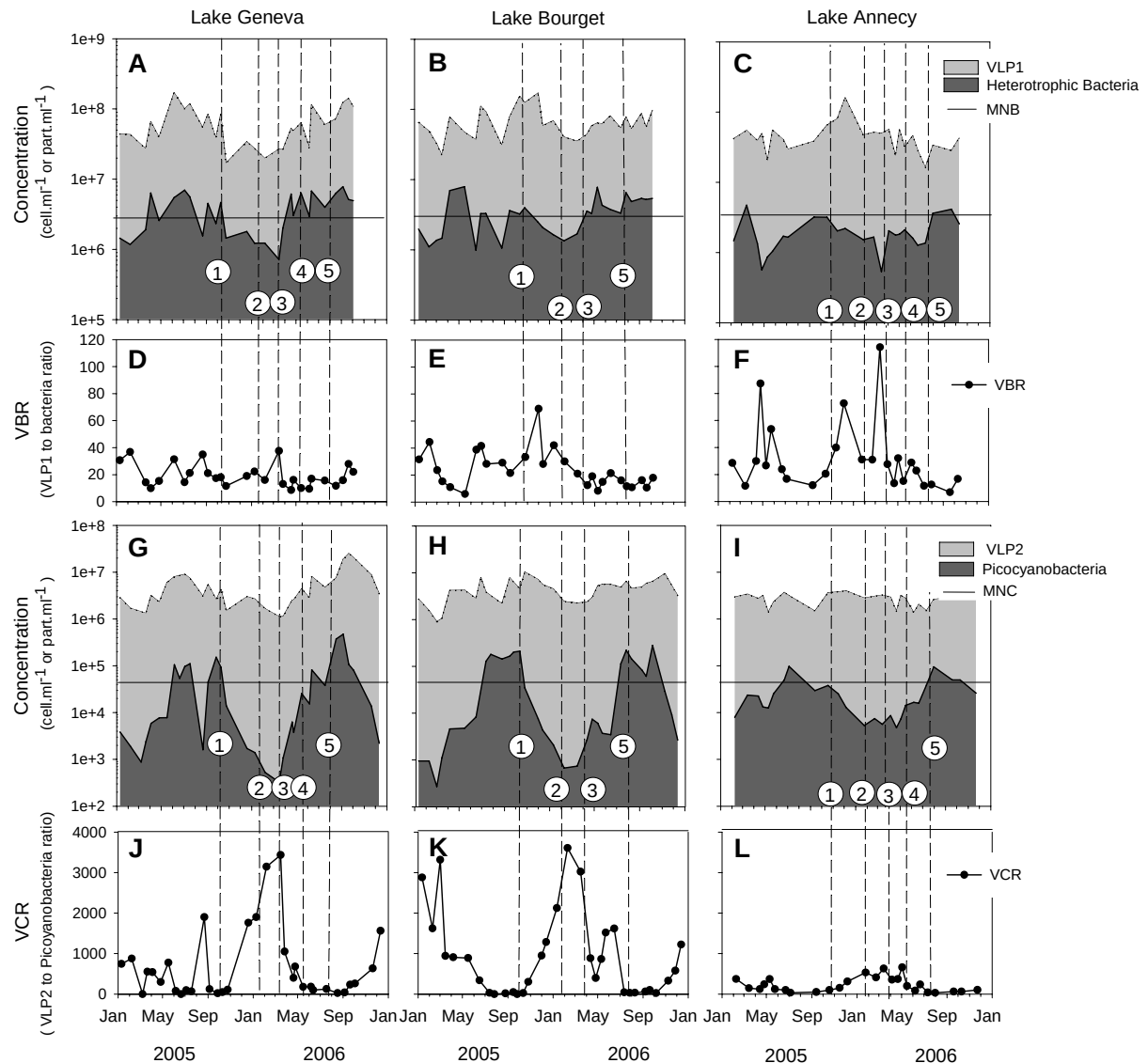


Figure 4. Time series for heterotrophic bacteria, picocyanobacteria and viruses referred to as probable bacteriophages (VLP1) or cyanophages (VLP2) from integrated values between 0 and 10 m depth for 2005-2006. Ratios of VLP1 to bacteria and VLP2 to picocyanobacteria are provided. The sampling periods corresponding to the dilution experiments have been symbolised by a dashed line and a serial number.

Table 3: Results of ANOVA one way (test post hoc- tuckey) used to test for differences with sampling depth and with the time.

Variable	Depth		Time	
	F-Value	P-Value	F-Value	P-Value
LAKE GENEVA				
Temperature (°C)	13.817	<0.05	27.249	<0.05
P-PO ₄ (mg.L ⁻¹)	22.023	<0.05	26.917	<0.05
N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	18.63	<0.05	26.917	<0.05
N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	15.39	<0.05	18.81	<0.05
SiO ₂ (mg.L ⁻¹)	21.82	<0.05	26.917	<0.05
Picocyanobacteria	26.805	<0.05	26.805	<0.05
Het. Bacteria	14.201	<0.05	18.934	<0.05
Het. Flagellates	9.257	<0.05	16.927	<0.05
Ciliates	16.662	<0.05	16.927	<0.05
Virus Like Particles	18.934	<0.05	11.19	<0.05
LAKE BOURGET				
Temperature (°C)	8.067	<0.05	25.07	<0.05
P-PO ₄ (mg.L ⁻¹)	22.215	<0.05	22.215	<0.05
N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	22.215	<0.05	22.215	<0.05
N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	22.215	<0.05	22.215	<0.05
SiO ₂ (mg.L ⁻¹)	19.042	<0.05	22.215	<0.05
Picocyanobacteria	13.147	<0.05	18.235	<0.05
Het. Bacteria	8.232	<0.05	18.477	<0.05
Het. Flagellates	10.168	<0.05	19.249	<0.05
Ciliates	19.171	<0.05	19.249	<0.05
Virus Like Particles	7.681	<0.05	17.922	<0.05
LAKE ANNECY				
Temperature (°C)	14.326	<0.05	22.88	<0.05
P-PO ₄ (mg.L ⁻¹)	19.326	<0.05	19.326	<0.05
N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	17.653	<0.05	19.326	<0.05
N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	19.326	<0.05	19.326	<0.05
SiO ₂ (mg.L ⁻¹)	19.326	<0.05	19.326	<0.05
Picocyanobacteria	12.056	<0.05	16.454	<0.05
Het. Bacteria	11.769	<0.05	16.477	<0.05
Virus Like Particles	16.668	<0.05	23.335	<0.05

Relationships between the different variables

The results of the one way ANOVA showed that each (biological and chemical) parameter was significantly affected by time or depth (Table 3). Considering the organisation of variables in the epilimnion, polynomial RDA allowed us to identify two canonical axes explaining 87.8%, 89.1% and 75.2% of the heterotrophic bacterial and picocyanobacterial variations in Lake Geneva, Bourget and Annecy, respectively. In RDA biplots as shown in Fig. 5, the angle between response variables (heterotrophic bacteria, picocyanobacteria) and the explanatory variables (VLP1, VLP2, heterotrophic flagellates, ciliates, N-NH₄, N-NO₃, P-PO₄, SiO₂, temperature for Lakes Geneva, Bourget and without the protozoan for Lake Annecy) reflect their correlations. As a rule for the three lakes, we observed the central position of temperature revealing its strong structuring effect especially on heterotrophic bacteria. In the mesotrophic lakes, N-NH₄ and N-NO₃ were two explanatory variables which

significantly influenced the variance of heterotrophic bacterial abundances. Moreover, we noted that the variable VLP1 was significantly associated with heterotrophic bacteria in the three lakes suggesting here a clear host-parasite link. These tight co-evolutions were observed more especially during the stratification period (from May to October). Thus, the analysis showed that the dynamics of heterotrophic bacteria was significantly correlated with several explicative variables (temperature, dissolved nitrogen, VLP1) while the picocyanobacteria were not. The only strong correlation found for the picocyanobacteria was with the abundance of potential grazers. Concerning grazers (data available only for Lakes Bourget and Geneva) we observed a strong association between (1) picocyanobacteria and ciliates dynamics and (2) flagellates and heterotrophic bacteria in Lake Geneva. In Lake Bourget, ciliates and flagellates dynamics were linked equally to both picocyanobacteria and heterotrophic bacteria.

Dilution experiments

Both predators and viruses acting together were responsible for 26.9% of the heterotrophic bacterial mortality in autumn for Lake Geneva. If considering the predation alone, flagellates were responsible for 42.2% of the heterotrophic bacterial mortality, suggesting particular relationships (*e.g.* antagonism?) between the parasites and the predators. At the same period of the year, for Lake Bourget, viral lysis explained 13.5% of total bacterial mortality while the strict impact of predators was about 18.2%. In Lake Annecy, no significant impact could be established in fall (Table 1). In winter and early spring, no significant regressions were found between the dilution of the predators or the viruses plus predators and the net growth of the bacteria for any of the lakes. Towards the end of spring (May), a significant impact was found only in Lake Geneva, with viruses and predators explaining 36.8% of the bacterial mortality. The action of the predators alone or with the viruses was rather similar. At last, predators and viruses explained 71% and 25.1% of the bacterial mortality in Lake Geneva and Bourget, respectively, in summer. Predators alone explained 76.5% and 56.83% of this mortality. Clearly, there were no synergistically actions of viruses and predators in terms of bacterial mortality.

When considering picocyanobacterial loss, we could estimate predators and viruses to be responsible for 16.8 % and 7.6 % of their daily mortality in Lake Geneva and Bourget respectively, in autumn. Predators alone were responsible for 7% of this rate in Lake Geneva suggesting here a clear synergistically effect of viruses and nanoflagellates. In Lake Bourget, however, no significant relation could be established. The same “no correlation” results were also found during winter and spring for the three lakes, as mentioned above for the heterotrophs, except for two values dealing with the impact of predators (-85.9% and -9.4%) in Lake Geneva in March and May. In summer, predators and viruses could explain -31.5%, -22.55% and -49.34% of the picocyanobacterial mortality in Lake Geneva, Bourget and Annecy respectively, suggesting that viruses could in fact favor picocyanobacterial growth (Table 2).

No reliable data could be obtained for the smallest eukaryotic cells when applying the dilution method to the <11 μm communities water samples.

chemical (P-PO₄, N-NH₄, N-NO₃, SiO₂) and biological (heterotrophic flagellates, ciliates, VLP1, VLP2) variables. Dots are the dates (with month labels). Dashed arrows represented the heterotrophic bacteria and the picocyanobacteria. Full arrows represent the biplot scores of the explanatory variables for the individual terms of the polynomial. The lengths of all explanatory variables have been multiplied by 3 for clarity. The canonical axes 1 (horizontal) and 2 (vertical) represent respectively 60 % and 27.8 % of variance for Lake Geneva ; 72.9 % and 16.1 % of variance for Lake Bourget ; and, 63.4 % and 11.8 % for Lake Annecy.

Table 1: Percentage of heterotrophic bacterial removal due to flagellates grazing with or without viral lysis calculated on a daily base scale (see results) obtained at different periods of the year for Lakes Geneva, Bourget and Annecy. * symbolizes significant mortality percentage values ($p < 0.1$).

		Lake Geneva	Lake Bourget	Lake Annecy
Autumn	Predation + Lyses	26.9 *	13.5 *	1.4
	Predation	42.2 *	18.2 *	5.3
Winter	Predation + Lyses	-1.8	-8.7	1.6
	Predation	7.4	-5.3	0.9
Spring A	Predation + Lyses	9.1	2.5	1.4
	Predation	-17.4	2.2	5.3
Spring B	Predation + Lyses	36.8 *	No Data	-16.2
	Predation	37.3 *		-14.8
Summer	Predation + Lyses	71.0 *	25.10 *	32.97
	Predation	76.5 *	56.83 *	46.74

Table 2: Percentage of picocyanobacterial removal due to flagellates grazing with or without viral lysis calculated on a daily base scale (see results) obtained at different periods of the year for Lakes Geneva, Bourget and Annecy. * symbolizes significant mortality percentage values ($p < 0.1$).

		Lake Geneva	Lake Bourget	Lake Annecy
Autumn	Predation + Lyses	16.77 *	7.64 *	4.08
	Predation	6.99 *	-7.73	1.96
Winter	Predation + Lyses	-27.60	24.54	-10.21
	Predation	0.82	-14.30	2.55
Spring A	Predation + Lyses	-3.29	21.92	-3.23
	Predation	-85.93 *	25.37	-3.22
Spring B	Predation + Lyses	3.63	No Data	-6.81
	Predation	-9.45 *		17.02
Summer	Predation + Lyses	-31.54 *	-22.55 *	-49.34 *
	Predation	-35.47	-25.05	-23.38

Discussion

We aimed to address the relative impact of both flagellates and viruses on picoplanktonic mortality. Because we only interested in surface waters (*i.e.* the top 0-10 m layer) and selected periods of the year (*i.e.* a few days) separated by some weeks to months, we obviously obtained a partial picture of parasites-predators-preys interactions. However, we could observe major changes in the importance of parasites vs. small grazers as potential regulatory factors on bacterial and picocyanobacterial dynamics in the epilimnion of lakes Annecy, Bourget and Geneva. Using a modification of the dilution technique, we determined that flagellate grazing was a relative weak cause of picocyanobacterial mortality in autumn (7%) but a significant mortality source for the bacteria in autumn (up to 42%), spring (up to 37%) and summer (up to 76%). The increase of virus and grazers impact on bacteria during these periods was consistent with the observations from the statistical analysis performed on the *in situ* data. The largest impact on bacteria was especially recorded in summer where most of the half biomass could be removed daily in both lakes Geneva and Bourget. By comparison to the predators, viruses had only a minor mortality impact in all situations where we could detect an effect of this community on bacteria. Interestingly, *appr.* 10% of picocyanobacterial loss in autumn could be imputed to viral lysis alone. Such a percentage is typically in the range of data already reported by past [65, 68], even if the comparison with the literature should be considered with caution because of the variety of methods employed. In winter and early spring, *i.e.* at the period of relatively low productivity, no clear mortality impacts of either the viruses or the flagellates could be detected on either the bacterial or the picocyanobacterial community. Contrary to the two mesotrophic ecosystems, no clear impact was recorded all year long for the oligotrophic Lake Annecy. This suggests that the dilution method was not applicable to this permanent low-nutrient content ecosystem or that viruses and flagellates have no impact on prokaryotes mortality (see below). At last for the picocyanobacteria, we also obtained some significant negative values suggesting that predation (or more precisely the presence of only grazers $<11\ \mu\text{m}$) at end of spring in Lake Geneva and predation plus lysis in summer for the three lakes could favour picocyanobacterial growth, likely through nutrient regeneration.

To assess viral-induced mortality of picoplanktonic cells, various techniques can be used [66]. We chose to apply the dilution approach as previously described by Evans *et al.* [25] and Jacquet *al.* [35], which theoretically enables to determine both the impact of viruses and predators on prokaryotic and/or eukaryotic preys. When using the dilution method, it is of critical importance to verify, on one hand, the accuracy of each dilution in the various enclosures. As summarized in Fig. 1, we could obtain a fairly good dilution of viral abundance in agreement with the theory. It is noteworthy, however, that we also observed a higher variability in the dilution efficiency with Annecy water compared to both Lakes Geneva and Bourget. It was not possible to estimate how important was this variability and the lowest efficiency in the dilution process when considering treatments with water originated from Lake Annecy. On second hand, it is important to test that the dilution experiments yield interpretable results through the form of significant correlations between prey's growth rate estimates and the dilution factor [4, 22, 84]. As shown in Tables 1 and 2, only 18 out of 56 (*i.e.* 1/3) values could be considered as significant and be used unambiguously to assess virus- vs. flagellate impact on either the bacteria or the picocyanobacteria. No reliable data were obtained for assessing possible impacts on small eukaryotic phytoplankton. This is a very important aspect and some previous recent studies did not mention it [6, 35].

For the first time, the dilution approach was replicated in different lakes (3 ecosystems characterized by various trophic levels) and at contrasted seasonal periods (the four seasons). One of the first messages we would like to highlight here is the possibility that the method may not be transposable to all trophic levels conditions and all seasonal periods. Typically, bacteria did not show any significant increase of their net growth rates with respect to the dilution of viruses or predators, in the two mesotrophic lakes during winter and spring. Moreover, no significant positive regressions could be recorded in the oligotrophic lake Annecy all year long suggesting a possible trophic status (nutrient level?) effect. There can be several reasons for the absence of impact or only small capture of lysis and/or predatory events, and this is discussed below. Obviously, it seems that both temperature and nutrient levels were key factors to account for to give a first explanation (see below).

The incubation time of 24 to 48 h generally proposed for such experiments may be too short regarding some generation times at certain periods of the year, typically in winter. Based on the estimated instantaneous growth rate of heterotrophic bacteria which in autumn, winter and spring never exceeded 0.10 d^{-1} while in summer it reached 0.53, 0.21, 0.28 d^{-1} in Lake Geneva, Bourget and Annecy respectively, considering a 24-h period would have lead to inconsistent conclusions. This is the reason why we calculated viral and grazing impacts using either time incubation of 24 or 48 h in order to obtain accurate estimates of picoplanktonic mortality in autumn, winter and spring compared to summer. This duration is obviously a critical aspect to account for when applying this method since, applying a long incubation period may result in modifications of communities' abundance and diversity, while a too short period could hide lytic and/or predatory effects. Abedon *et al.* [3] who explored issues of latent period evolution as a function of the density of phage-susceptible bacteria could show that both the burst size (*i.e.* number of viruses released from each individual host organism) and the phage generation time are controlled by a latent period. Theory suggests that higher bacterial densities should select for shorter phage latent period. In other words, phages will also evolve a shorter latent period when either the host density is high or the host quality is good [2, 76]. In our case, in winter, with relatively low concentration of bacteria, viruses could have a long latent period, so that even 48 hours might have been too short to obtain a clear, if any, viral lysis impact photography.

We assume that, for both bacteria and picocyanobacteria, the host specificity is relatively high, so that, absence of viral lysis detection may be due to low successful encounters between viruses and hosts. In parallel to this assumption, we can also relate a problem with microbial communities' abundance (as already touched above) so that the dilution method will not be able to give us a clear quantitative viral impact when heterotrophic bacteria and viruses are not abundant enough. Indeed, in such a situation, it may be argued that the low contact rates between bacteria and viruses or predators might explain the absence of clear results. Both the *in situ* monitoring survey of the different communities or groups and the series of experimental approaches allowed us to consider more carefully the idea that host density thresholds can be an important aspect. In a mesocosm study, Jacquet *et al.* [36] pointed out that the coccolithophoride *E. huxleyi* had to reach a threshold value before its specific viruses could be detected unambiguously and measured to have an important control on the phytoplankton bloom. The same might be true for Evans *et al.* [25] when applying the dilution approach to *Micromonas* populations in the same experimental study. On the basis of this assumption, we calculated the minimal number of heterotrophic bacteria (MNB) or picocyanobacteria (MNC) for which the dilution technique should theoretically be used (Fig. 3). We observed from our 14 experiments that the dilution experiments worked as expected (satisfactory linear regression between bacterial growth rates and dilution level) when heterotrophic bacterial and picocyanobacterial abundances were at least $2.6 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ and $3.8 \times 10^4 \text{ cells.mL}^{-1}$, respectively. However, this hypothesis involving a possible

MNB and MNC was not always appropriate. Indeed, with low concentrations of heterotrophic bacteria, for example in Lake Geneva, in autumn (between the fraction 40 % and 20%) we could find an impact of viruses, while for the same range of concentration (between the fraction 70 % and 40%) and consequently the same probability of contact between heterotrophic bacteria and viruses or predators we could not establish an impact of the viruses in winter.

Hence, an explanation for the absence of regression between dilution (of viruses and/or grazers) and the bacterial net growth rate could be that viruses and grazers had really no impact, more especially during periods of low metabolic activity. During winter (when temperature was clearly below 6°C), bacteria are likely to have a slow metabolism, translating in low growth. Viruses must use bacterial metabolism to replicate and cannot maintain their concentration without healthy and active hosts. A virus in a cell characterized by a reduced metabolism is unlikely to engage the lytic mechanism, and consequently the impact on bacterial mortality should be very low or inexistent at the time scale investigated here. The statistical analysis of *in situ* survey data confirmed such a hypothesis by revealing temperature as a central parameter for each lake to explain the dynamics of heterotrophic bacteria. Also, several studies suggested that physical (such as temperature) and chemical (such as the availability of nutrients) conditions may have an important influence also on viral strategies. Typically, lysogenic infection is considered the most favourable way of bacterial infection in waters characterized by low bacterial and primary production [38, 81, 82]. Bongiorno *et al.* [10] indicated that oligotrophic conditions drive viral life strategies, towards lysogenic rather than lytic infection. The metabolic status of the host is indeed crucial for viral development as high host growth rates can support higher viral turnover rates [21, 43]. This feature fits well to Lake Annecy (and bacterial growth limitation was indeed demonstrated experimentally in our lab, Tadonléré unpublished) or the winter season for Lakes Geneva and Bourget, where viruses could have adopted a lysogenic infection as a way of life strategy. If this hypothesis held, we could expect a decrease of virus proportion in the water column during winter. Indeed, viruses are typically 10 fold higher in abundance than heterotrophic bacteria. During an annual succession, the VBR is likely to remain relatively high because of the necessity for the viruses to use heterotrophic bacteria for maintaining their existence in the water column. This was not the case and can be referred to as the VBR paradox. At the end of autumn, during winter and the beginning of spring, heterotrophic bacteria concentration decreased considerably. However, the VBR during these seasonal periods remained high (Fig. 3) indicating that heterotrophic bacteria decreased more than viruses. As no important lytic infection was recorded, it is expected that viral abundances would stay constant or decreased due to viral decay [52]. Surprisingly the number of viruses remained high. A possible explanation is the existence of chronic infection where expulsion of viruses from the hosts operate through simple diffusion through the bacterial cell coat. Such a chronic infection has been reported once at the community level in an aquatic environment [34]. If we assume this chronic infection possible, we propose that viruses may use both lytic, lysogenic and chronic infections over the year depending on the host cell metabolism in relation to seasons and resource scarcity.

Among significant values found for the picocyanobacterial community, we observed in both spring and summer that growth rates were only negatively correlated to the dilution and 3 out of the 4 values were found in the <30 KDa diluent. By comparison, there was no negative relationship when considering the bacterial community. More than 10 years ago, Suttle [67] reported lower growth rates of marine *Synechococcus* incubated and diluted in virus-free water. One explanation provided by the authors was that the dilution with virus-free water prevented nutrient recycling through viral lysis and this impacted negatively growth rates. Our results, obtained in summer during depletion of nutrients, seem to corroborate

Suttle and colleagues assumptions although we did not measure it directly. Landry *et al.* [41] also suggested that nutrient amendment should be done while using the dilution approach in situations where nutrients are likely to be limiting for phytoplanktonic population growth.

The dilution method initially used to estimate the mortality of bacteria due to viral lysis also allowed to reveal the complex interactions between microbial communities and to confirm most of the detailed analysis performed on *in situ* survey data. We indeed observed for all experiments in which impacts of predators and viruses were estimated on heterotrophic bacteria, that the relative impact of grazers alone was higher than the impact measured in the presence of both viruses and predators. Consequently the presence of viruses seemed to have a positive impact for bacterial growth rates, suggesting that they could favour the multiplication of non infected bacteria. This kind of results has previously been discussed [27, 29, 49, 50, 51, 78] and we assume that viral lysis products such as cell content and cell wall fragments could indeed enter the organic matter pool and be exploited by non-infected bacteria, resulting by increasing abundances with dilution. This viral shunt stimulates bacterial production and thus viruses have a positive effect on heterotrophic bacterial growth. Similarly, a positive impact could be observed for picocyanobacteria growth suggesting that the recycling of nutrients due to viral lysis is also positive for the picophytoplankton. Thus, phages seem to be “beneficial” for prokaryotes (and maybe also for phytoplankton) mediated processes at the community level [78]. In our experimental treatments, viruses and predators had a strong positive (negatives values) impact on picocyanobacteria in summer in all lakes. We assume that heterotrophic flagellates did not affect picocyanobacterial mortality. Indeed, in all dilutions experiments, heterotrophic flagellate (<11 μm) explained only one time picocyanobacteria mortality. These results confirmed previous studies [75] demonstrating that these cells are preferentially consumed by ciliates. It is thus tempting to propose that the lack of lysis or grazing for the picocyanobacterial community in spring and summer could be related to our choice of considering in the dilution approach only grazers <11 μm , eliminating the crucial fractions of picocyanobacteria predators, *i.e.* flagellates with a greater size, the ciliates and the metazooplanktonic community [15, 20, 54]. This hypothesis is consistent with the relationships suggested by the statistical analysis of *in situ* data, especially the tight coupling of picocyanobacteria and ciliates dynamics in the two mesotrophic lakes.

Other reasons can be argued as above for the low viral impact recorded in our study. Some host populations are likely to be resistant to viral impact. Most cultured *Synechococcus* strains have been shown to be relatively resistant to co-occurring cyanophages [69, 77]. More recently, Hewson & Fuhrman [33] reported that the presence of potentially homoimmune common Operational Taxon Units may make viral effects difficult to detect using either enrichment or dilution approaches. This may be true for *Synechococcus* groups but also for specific bacterial lineages. It could be meant that the impact of lytic viruses on a variety of assemblages may only be pronounced transiently or when conditions causing lysogenic induction arise. We could have missed these periods.

Flagellates can impact directly the viral abundance and infectivity through direct consumption or by grazing preferentially on viral-infected cells. The interactions between viruses and grazers on bacteria are probably complex [37] and various types of synergism effects could be involved. Selective feeding by flagellates on bacteria can alter total abundance as well as relative contributions of different host populations within natural bacterial assemblages [39, 61, 71], thus impacting on competition between grazers and viruses per prey.

The removal of viruses in the different diluents may be a problem for estimating viral lysis compared to protozoan grazing. When considering the fraction of whole water in the <0.2 μm treatments (no losses of viruses expected), we noticed that VLP1 reductions were

about 2 to 10% and between 7 to 22% for VLP2. It was not possible from our results to test whether such percentages could affect dramatically virus-host interactions. This aspect was clearly a main cause for the absence of results for the small phytoplankters since the filtration on 0.2 μm eliminated between 80 and 90% of the VLP4 (not shown) which are strongly supposed to be eukaryotic viruses [24]. The huge loss of this viral group seems to be a clear limitation of the possibility to use this dilution approach to assess their potential role on small eukaryotic phytoplankters.

At last, the basic assumption of the dilution approach may not be true. Typically, both grazers and parasites are supposed to follow a linear response with respect to the dilution, which may be not always true. It is likely that with increasing dilution, the host physiological state may change and with it the relationship with either the grazers or the viruses. Also, in the oligotrophic Lake Annecy and during winter/spring seasons in mesotrophic lakes, the linear regression between the dilution and the decrease pressure of viruses and/or predators was not statistically significant, suggesting that this type of dilution method could lead to atypical results in some specific environmental conditions.

Acknowledgments

We are grateful to Pascal Perney, Jean-Christophe Hustache, Pascal Chifflet (INRA Thonon) and Gérard Paolini (CISALB, Aix-les-Bains), who realised the sampling of the three lakes during the period of this study and Annie Millery (University of Savoie) for her assistance in protozoan counting. We want to thank Denis Grivel for English improvements. Chemical analyses were realised by late Jean-Pierre Bosse and Jérôme Lazzaroto (INRA, Thonon).

References

1. Abedon ST (2006) Phage Ecology. In: Abedon CST (ed) The Bacteriophages. Oxford University Press, p 37-46
2. Abedon ST, Herschler TD, Stopar D (2001) Bacteriophage latent period evolution as a response to resource availability. *Appl Environ Microbiol* 67:4233-4241
3. Abedon ST, Hyman P, Thomas C (2003) Experimental examination of bacteriophage latent period evolution as a response to bacterial availability. *Appl Environ Microbiol* 69:7499-7506
4. Agis M, Granda A, Dolan DR (2007) A cautionary note: Examples of possible microbial community dynamics in dilution grazing experiments. *J Exp Mar Biol Ecol* 341:176-183
5. Anneville O, Ginot V, Druart JC, Angeli N (2002) Long-term study -1974-1998 of seasonal changes in the phytoplankton in Lake Geneva : a multi-table approach. *J Plankton Res* 24:993-1008
6. Baudoux AC, Noordeloos AAM, Veldhuis MJW, Brussaard CPD (2006) Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during two spring blooms in spring temperate coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 44:207-217
7. Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Bouvy M, Arfi R (2005) Low consumption of virus-sized particles by heterotrophic Nanoflagellates in two lakes of the French Massif Central. *Aquat Microb Ecol* 39:205-209

8. Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Carrias JF, Portelli C (2003) Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophy. *Freshwat Biol* 48:810-822
9. Boenigk J, Arndt H (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:465-480
10. Bongiorno L, Magagnini M, Armeni M, Noble RT, Danovaro R (2005) Viral production, decay rates, and life strategies along a trophic gradient in the north Adriatic Sea. *Appl Environ Microbiol* 71:6644-6650
11. Bouvier T, del Giorgio PA (2007) Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Envir Microbiol* 9:287-297
12. Bratbak G, Heldal M, Norland S, Thingstad TF (1990) Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl Environ Microbiol* 56:1400-1405
13. Brussaard CPD (2004) Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 70:1506-1513
14. Brussaard CPD, Bratbak G, Baudoux AC, Ruardij P (2007) *Phaeocystis* and its interaction with viruses. *Biogeochem* 83:201-215
15. Callieri C, Stokner JG (2002) Fresh water autotrophic picoplankton: a review. *J Limnol* 61:1-14
16. Campbell L, Carpenter EJ (1986) Estimating the grazing pressure of heterotrophic nanoplankton on *Synechococcus* spp. using the sea water dilution and selective inhibitor techniques. *Mar Ecol Prog Ser* 33:121-129
17. Caron DA (1983) Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedure. *Appl Environ Microbiol* 46:249-268
18. Castberg T, Larsen A, Sandaa RA, Brussaard CPD, Egge JK, Heldal M, Thyrhaug R, van Hanne EJ, Bratbak G (2001) Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Haptophyta). *Mar Ecol Prog Ser* 221:39-46
19. Chen F, Lu JR, Binder BJ, Liu YC, Hodson RE (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. *Appl Environ Microbiol* 67:539-545
20. Comte J, Jacquet S, Viboud S, Fontvieille D, Paolini G, Domaizon I (2006) Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, February to July 2002). *Microb Ecol* 52:72-89
21. Corinaldesi C, Crevatin E, Del Negro P, Marini M, Russo A, Fonda-Umani S, Danovaro R (2003) Large-scale spatial distribution of virioplankton in the Adriatic Sea: Testing the trophic state control hypothesis. *Appl Environ Microbiol* 69:2664-2673
22. Dolan DR, Gallegos CL, Moigis A (2000) Dilution effects on microzooplankton in dilution grazing experiments. *Mar Ecol Prog Ser* 200:127-139
23. Domaizon I, Viboud S, Fontvieille D (2003) Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microb Ecol* 46:317-329

24. Duhamel S, Domaizon I, Personnic S, Jacquet S (2006) Assessing the microbial community dynamics and the role of bacteriophages in bacterial mortality in lake Geneva. *J Wat Sci* 19:115-126
25. Evans C, Archer SD, Jacquet S, Wilson WH (2003) Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquat Microb Ecol* 30:207-219
26. Fenchel T (1986) Protozoan filter feeding. *Progr Protistol* 1:65-113
27. Fuhrman JA (1992) Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: The microbial food web. In P.G.Falkowski and A.D. Woohed (eds), *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum:361-383
28. Garza DR, Suttle CA (1995) Large double-stranded DNA viruses which cause the lysis of marine heterotrophic nanoflagellates (*Bodo* sp.) occur in natural marine virus communities. *Aquat Microb Ecol* 9:203-210
29. Gobler CJ, Hutchins DA, Fisher NS, Cosper EM, Sanudo-Wilhelm S (1997) Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnol Oceanogr* 42
30. Goddard V, Baker AC, Davy JE, Adams DG, M.M. DV, Thackeray SJ, Maberly SC, Wilson WH (2005) Temporal distribution of viruses, bacteria and phytoplankton throughout the water column in a freshwater hypereutrophic lake. *Aquat Microb Ecol* 39:211-223
31. Gonzales N, Suttle CA (1993) Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles: ingestion and digestion. *Mar Ecol Prog Ser* 94:1-10
32. Hagström Å, Azam F, Andersson A, Wikner J, Rassoulzadegan F (1988) Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar Ecol Prog Ser* 49:171-178
33. Hewson I, Fuhrman JA (2007) Characterization of lysogens in bacterioplankton assemblages of the Southern California Borderland. *Microb Ecol* 53:631-638
34. Hofer JS, Sommaruga R (2001) Seasonal dynamics in a alpine lake: importance of filamentous forms. *Aquat Microb Ecol* 26:1-11
35. Jacquet S, Domaizon I, Personnic S, Duhamel S, Heldal M, Pradeep Ram AS, Sime- Ngando T (2005) Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshwat Biol* 50:627-645
36. Jacquet S, Heldal M, Iglesias-Rodriguez D, Larsen A, Wilson W, Bratbak G (2002) Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquat Microb Ecol* 27:111-124
37. Jacquet S, Simek K, Weinbauer MG, Sime-Ngando T, Bouvier T, Bettarel Y (2006) Relationships between viruses, bacteria and small grazers in aquatic ecosystems. Contributed talk to ISME-11, Vienna, Austria, August. (available at <http://jacquet.stephan.free.fr/diaporamas.htm>).
38. Jiang SC, Paul JH (1998) Significance of lysogeny in the marine environments: studies with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microb Ecol* 35:235-243
39. Jürgens K, Pernthaler J, Schalla S, Amann R (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* 65:1241-1250

40. Landry MR, Hassett RP (1982) Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Mar Biol* 67:283-288
41. Landry MR, Kirshtein J, Constantinou J (1995) A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 120:53-63
42. Larsen A, Flaten GAF, Sandaa RA, Castberg T, Thyrrhaug R, Erga SR, Jacquet S, Bratbak G (2004) Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. *Limnol Oceanogr* 49:180-190
43. Lensky RE (1988) Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage. *Adv Microb Ecol* 10:1-44
44. Li WKW, Dickie PM (2001) Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and viroplankton in a coastal Inlet (Belford basin) by flow cytometry. *Cytometry* 44:236-246
45. Makarewicz V, Legendre P (2002) Nonlinear redundancy analysis and canonical correspondence analysis based on polynomial regression. *Ecology* 83:1146-1161
46. Mann NH, Cook A, Millard A, Bailey S, Clokie M (2003) Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature* 424:741
47. Maranger R, Bird DF (1995) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar Ecol Prog Ser* 121:217-226
48. Marie D, Brussaard CPD, Thyrrhaug R, Bratbak G, Vaulot D (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 65:45-52
49. Middelboe M (2000) Bacterial growth rate and marine virus host dynamics. *Microb Ecol* 40:114-124
50. Middelboe M, Jorgensen NOG (2006) Viral lysis of bacteria: an important source of dissolved amino acids and cell wall compounds. *J Mar Biol Assoc UK* 86:605-612
51. Middelboe M, Jorgensen NOG, Kroer N (1996) Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of non-infected marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 62:1991-1997
52. Noble RT, Fuhrman JA (2000) Rapid virus production and removal as measured with fluorescently labeled viruses as tracers. *Appl Environ Microbiol* 66:3790-3797
53. Peduzzi P, Schiemer F (2004) Bacteria and viruses in the water column of tropical freshwater reservoirs. *Envir Microbiol* 6:707-715
54. Pernthaler J, Simek K, Sattler B, Schwarzenbacher A, Bobkova J, Psenner R (1996) Short term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligomesotrophic lake. *J Plankton Res* 18
55. Pernthaler J (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Rev Microb* 3:537-546
56. Pradeep Ram AS, Boucher D, Sime-Ngando T, Debroas D, Romagoux JC (2005) Phage bacteriolysis, protistan bacterivory, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. *Microb Ecol* 50:64-72

57. Sandaa RA, Larsen A (2006) Seasonal variations in viral-host populations in Norwegian coastal waters: Focusing on the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* species. *Appl Environ Microbiol* 72:4610-4618
58. Sanders RW, Caron DA, Berninger UC (1992) Relationship between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and freshwaters: an interecosystem comparison. *Mar Ecol Prog Ser* 86:1-14
59. Seymour JR, Seuront L, Doubell M, Waters RL, Mitchell JG (2006) Microscale patchiness of virioplankton. *J Mar Biol Assoc UK* 86:551-561
60. Sherr EB, Sherr BF (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:293-308
61. Simek K, Kojecka P, Nedoma J, Hartman P, Vrba J, Dolan DR (1999) Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnol Oceanogr* 20:1634-1644
62. Simek K, Pernthaller J, Weinbauer MG, Hornak K, Dolan JR, Nedoma J, Masin M, Amann R (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl Environ Microbiol* 67:2723-2733
63. Sime-Ngando T, Bettarel Y, Chartogne C, Sean K (2003) The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Res Dev Microbiol* 7:481-497
64. Sime-Ngando T, Bourdier G, Amblard C, Pinel-Alloul B (1991) Short-term variations in specific biovolumes of different bacterial forms in aquatic ecosystems. *Microb Ecol* 21:211-226
65. Suttle CA (2000) Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. *Kluwer Academic publishers*:563-589
66. Suttle CA (2005) The virosphere: the greatest biological diversity on Earth and driver of global processes. *Envir Microbiol* 4:481-482
67. Suttle CA (1996) Viruses as biological control agents for blooms of marine phytoplankton. In: *Proceedings of the Brown Tide Summit*, New York Sea Grant Institute, p 71-76
68. Suttle CA, Chan AM (1994) Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* 60:3167-3174
69. Suttle CA, Chan AM (1993) Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Mar Ecol Prog Ser* 92:99-109
70. Suzuki K, Tsuda A, Kiyosawa H, Takeda S, Nishioka J, Saino T, Takahashi M, Wong CS (2002) Grazing impact of microzooplankton on a diatom bloom in a mesocosm as estimated by pigment-specific dilution technique. *J Exp Mar Biol Ecol* 27:99-120
71. Suzuki MT (1999) Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquat Microb Ecol* 20
72. Thingstad F (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol Oceanogr* 45:1320-1328

73. Thingstad TF, Lignell R (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat Microb Ecol* 13:19 - 27
74. Vault D (1989) CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise* 2:8
75. Verni F, Gualtieri P (1997) Feeding Behaviour in Ciliated Protists. *Micron* 28:487-504
76. Wang IN, Dykhuizen E, Slobodkin LB (1996) The evolution of phage lysis timing. *Evol Ecol* 10:545-558
77. Waterbury JB, Valois FW (1993) Resistance to co-occurring phages enables marine *synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl Environ Microbiol* 59:3393-3399
78. Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28:127-181
79. Weinbauer MG, Christaki U, Nedoma A, Simek K (2003) Comparing the effects of resource enrichment and grazing on viral production in a meso-eutrophic reservoir. *Aquat Microb Ecol* 31:137-144
80. Weinbauer MG, Peduzzi P (1995) Effect of virus-rich high molecular weight concentrates of seawater on the dynamics of dissolved amino acids and carbohydrates. *Mar Ecol Prog Ser* 127:245-253
81. Weinbauer MG, Suttle CA (1999) Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquat Microb Ecol* 18:217-225
82. Williamson SJ, Houchin LA, McDaniel L, Paul JH (2002) Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida. *Appl Environ Microbiol* 68:4307-4314
83. Wilson W, Mann NH (1997) Lysogenic and lytic viral production in marine microbial communities. *Aquat Microb Ecol* 13:95-100
84. Worden AZ, Binder BJ (2003) Application of dilution experiments for measuring growth and mortality rates among *Prochlorococcus* and *Synechococcus* populations in oligotrophic environments. *Aquat Microb Ecol* 30:159-174

V.2 Approche par la méthode de fractionnement des communautés et enrichissement viral :

Première approche de l'impact des virus et prédateurs flagellés sur la diversité de la communauté bactérienne du lac Léman

V.2.a Contexte et objectifs

Les organismes microbiens sont considérés comme une fraction considérable de la diversité génétique globale de la biosphère (Angly *et al.* 2006), mais les facteurs et processus déterminants cette composition sont encore très mal connus. Différents travaux (Simek *et al.* 1999, Cottrell & Kirchman 2000, Bouvier & Del Giorgio 2002) ont pu mettre en évidence l'importance du contrôle par les facteurs environnementaux tels que la nature des substrats organiques, les nutriments et la prédation. Il est aujourd'hui reconnu que les virus et prédateurs flagellés peuvent jouer un rôle significatif sur le maintien et les modifications de la diversité microbienne. L'impact des protistes flagellés sur la composition de la communauté procaryotique a été mis en évidence, par exemple, par les travaux de Simek *et al.* (1997), Jurgens *et al.* (1999), Simek *et al.* (1999), Suzuki (1999), Langenheder & Jurgens (2001), ou encore Gasol *et al.* (2002). De fortes spéculations désignent également l'infection virale comme un facteur clef dans la régulation de la structure et la composition de la communauté procaryotique. Malgré une meilleure connaissance sur l'influence des virus sur la croissance du bactérioplancton et par conséquent sur les cycles biogéochimiques (Bratbak *et al.* 1992, Fuhrman 1992, Fuhrman & Suttle 1993, Middelboe *et al.* 1996, Middelboe & Lyck 2002, Poorvin *et al.* 2004), le rôle des virus dans la composition taxonomique des communautés procaryotiques est encore très mal appréhendé (Bouvier & Del Giorgio 2007, Winter *et al.* 2004, 2005). S'il existe différents modèles numériques incluant les virus dans les réseaux trophiques microbiens en milieu marin (Bratbak *et al.* 1992, 1994, Fuhrman & Suttle 1993, Wilhelm & Suttle 1999), très peu néanmoins ont intégré l'impact des virus sur la composition de l'assemblage bactérien (Thingstad & Lignell 1997, Thingstad 2000).

La compétition pour les ressources est largement établie comme un processus primordial contrôlant l'abondance relative des bactéries. Ainsi, les bactéries les plus abondantes sont présumées être les plus compétitives. L'infection virale est un processus dépendant de la densité des communautés et donc de la probabilité de rencontre du virus et de sa cellule hôte. Par conséquent les virus sont supposés avoir un très grand impact sur les assemblages taxonomiques les plus abondants, permettant aux taxons moins abondants de co-

exister. Ce modèle hypothétique est connu sous le nom du « killing the winner » (Bratbak *et al.* 1992, Fuhrman 1992, Fuhrman & Suttle 1993, Thingstad & Lignell 1997, Thingstad 2000). Depuis le concept du « killing the winner » de nombreux travaux ont pu mettre en évidence le rôle des virus dans le contrôle de la diversité procaryotique (Weinbauer & Hofle 1998, Middelboe *et al.* 2001) tout en confirmant cette théorie (Suttle 1992, Peduzzi & Weinbauer 1993) ou en la nuancant (Van Hannen *et al.* 1999, Schwalbach *et al.* 2004, Hewson & Fuhrman 2006, Bouvier & del Giorgio 2007).

Récemment, les travaux de Dorigo (2006) ont permis de mettre en évidence la relative stabilité de la diversité procaryotique dans les trois lacs péri-alpins, diversité appréhendée au moyen de la technique DGGE. A part ces travaux, il n'existe pour le moment que très peu de données sur la diversité microbienne des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy et clairement aucune donnée sur l'impact des virus et des prédateurs sur cette diversité. Sur la base des hypothèses issues de nos observations *in situ* et pour se calquer sur la méthode de dilution en terme de fractionnement des communautés, nous avons réalisé une expérimentation simplifiée (deux classes de taille considérée, $<2\ \mu\text{m}$ et $<10\ \mu\text{m}$, enrichies ou non en particules virales), sur le lac Léman au mois d'avril et mai 2004 afin de visualiser l'effet des prédateurs flagellés et de l'enrichissement en particules virales sur la diversité procaryotique appréhendée par DGGE. Les objectifs de ces deux expériences ont été (i) d'évaluer les modifications de la diversité bactérienne à deux périodes de l'année, (ii) d'observer ou non l'effet structurant des prédateurs et des virus sur la richesse spécifique bactérienne, (iii) de comparer l'effet des prédateurs et des virus.

V.2.b Principaux résultats

L'approche expérimentale (Annexe V, chapitre III) a considéré deux types d'assemblages microbiens ($<2\ \mu\text{m}$ et $<10\ \mu\text{m}$) assujétis ou pas à une modification des concentrations virales qui était de + 11 à 57% (Tableau V-2). Cette expérience (dont seuls les résultats concernant la diversité bactérienne sont présentés ici) a été répétée 2 fois, au mois d'avril et mai 2004, alors que les conditions physico-chimiques étaient sensiblement différentes : la température était plus élevée en mai ainsi que la teneur en N-NH_4 alors que de plus faibles concentrations en P-PO_4 et N-NO_3 étaient mesurées aux cours de la 2^{nde} expérimentation (Tableau V-1). Les taux de croissance bactériens (taux de croissance brut en 24 h en l'absence de prédateurs) et la teneur en chlorophylle *a* ont été multipliés par 7 et 6,5

respectivement entre le mois d'avril et le mois de mai, soulignant des changements importants dans l'activité des microorganismes hétérotrophes et autotrophes.

Tableau V-1 : Synthèse des caractéristiques physiques (température), chimiques (N-NH₄, N-NO₃, P-PO₄) et biologiques (chlorophylle a et taux de croissance bactérien) dans l'épilimnion du Léman (station de référence) au démarrage des deux expériences *in situ* de fractionnement et d'enrichissement.

	Avril	Mai
Température (°C)	6,35	8,88
N-NH ₄ (mg.L ⁻¹)	0,003	0,022
N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	0,64	0,47
P-PO ₄ (mg.L ⁻¹)	0,018	0,003
Chlorophylle a (mg.m ⁻³)	0,48	3,14
Taux de croissance bactérien (T0-T24 heures, j ⁻¹)	0,04	0,28

C'est au début de l'expérience du mois d'avril que les bactéries et flagellés hétérotrophes ont été les plus abondants alors que les virus l'ont été au cours de la seconde expérimentation (Tableau V-2). Il est apparu que les impacts (VIBM) de la lyse virale sur la mortalité bactérienne ont été faibles au début de l'expérience (en moyenne $\pm$ E-T : 5,62% $\pm$ 2,16 en avril ; 5,41% $\pm$ 2,41 en mai) comme à la fin, à T96 heures (en moyenne $\pm$ E-T : 1,15 $\pm$ 0,86 en avril ; 2,07 $\pm$ 2,05 en mai).

Tableau V-2 : Abondances des communautés microbiennes (bactéries hétérotrophes, virus, flagellés hétérotrophes et pigmentés), % de mortalité bactérienne engendré par la lyse virale (VIBM) à T0 et T96 heures au cours des deux expériences *in situ* de fractionnement et d'enrichissement (E).

	T0				T96			
	<2	<10	<2 E	<10 E	<2	<10	<2 E	<10 E
Avril								
Bact. hétérotrophes (Cell.ml ⁻¹)	4,0E+6	4,3E+6	4,1E+6	4,3E+6	9,1E+6	7,4E+6	1,1E+7	8,6E+6
Virus (Part.ml ⁻¹)	3,6E+7	3,4E+7	5,7E+7	4,3E+7	3,4E+7	4,1E+7	4,7E+7	4,9E+7
Flagel. hétérotrophes (Cell.ml ⁻¹)	9,5E+1	3,9E+2			7,0E+2	1,2E+3		
Flagel. pigmentés (Cell.ml ⁻¹)	0	1,0E+3			0	2,4E+3		
VIBM (%)	8,79	3,89	4,76	5,05	0,04	1,29	2,14	1,16
Mai								
Bact. hétérotrophes (Cell.ml ⁻¹)	2,4E+6	2,7E+6	2,3E+6		5,9E+6	4,1E+6	6,8E+6	
Virus (Part.ml ⁻¹)	4,9E+7	4,9E+7	5,8E+7		5,5E+7	6,1E+7	6,7E+7	
Flagel. hétérotrophes (Cell.ml ⁻¹)	4,3E+1	2,7E+2			5,2E+1	9,2E+2		
Flagel. pigmentés (Cell.ml ⁻¹)	0	9,6E+1			0	3,9E+2		
VIBM (%)	3,77	8,24	4,24		0,13	4,22	1,86	

L'expérimentation menée en avril a conduit, quel que soit le traitement considéré, à une diminution de la richesse (*i.e.* du nombre de bandes observées en DGGE entre T0h et T96h) mais avec une amplitude variable selon les traitements. En présence des prédateurs

(<10 μm), cette diminution était moindre comparée aux traitements <2 μm , qu'ils soient enrichis en virus ou non. En mai, la tendance générale était plutôt celle d'une stabilité de la richesse (fraction <2 μm) ou d'une augmentation observée plus spécifiquement dans les traitements <10 μm en présence des bactérivores et petits autotrophes. Toutefois, même lorsqu'on enregistrerait une stabilité du nombre total de bandes, il a été possible d'observer des modifications de profil (apparition, disparition de bandes) au cours du temps. Dans un premier temps, les effets observés peuvent donc être résumés comme suit :

- un effet lié à l'isolement des communautés bactériennes de leurs prédateurs zooplanctoniques.

Nos résultats ont en effet permis de mettre en évidence une modification de la structure de la communauté bactérienne suite au fractionnement, de manière très nette en avril dans la fraction <2 μm , période à laquelle les concentrations initiales en virus sont faibles. Durant cette première expérimentation une perte importante de diversité est enregistrée en particulier dans les traitements ne contenant que les virus et les bactéries hétérotrophes. Comparativement, l'incubation de la fraction <2 μm a conduit à des variations moindres dans les profils DGGE en mai, et la diversité initiale a été maintenue. Il est important de noter que ces 2 périodes ont été caractérisées par des taux de croissance bactériens initiaux très différents (Tableaux V-1) mettant en évidence une plus forte limitation potentielle par les ressources disponibles (+ un effet potentiel de la température) de l'activité métabolique, en avril. Nous suspectons que ce moins bon état physiologique des bactéries en avril ait pu affecter leur diversité et la modification de cette dernière d'autant plus. L'évolution des traitements <10 μm sans enrichissement viral semble conforter cette hypothèse, puisqu'en avril une diminution de la diversité a été observée avec un fort remaniement dans les profils DGGE, tandis qu'en mai, dans des conditions de ressources et d'activité plus favorables, le nombre de bandes augmentait en présence des bactérivores.

- l'absence d'impact net des virus.

La comparaison des traitements enrichis et non enrichis (à T96h) a montré que l'enrichissement en particules virales (variant pourtant de +11 à 57%) n'a pas induit de modification notable de la structure bactérienne. Toutefois, lors de l'expérimentation effectuée en mai, la stabilité du profil DGGE dans la fraction <2 μm enrichie était

parfaite comparativement au contrôle, suggérant ici un effet stabilisateur potentiel des virus.

- un effet lié à la présence des flagellés hétérotrophes et pigmentés.

L'effet général de la présence des nanoflagellés s'est toujours traduit par une moindre perte de diversité (en comparaison des traitements sans prédateurs), voire une augmentation de la diversité bactérienne en mai. Aux deux périodes, on notait que les pertes d'abondances bactériennes imputables aux bactérivores étaient légèrement différentes, de 27,4% en avril et 11,4% en mai, entre le début et après 96 heures d'incubation (valeurs établies par différence des taux de croissance bactérien dans les enceintes <10 et <2 µm). Les bactérivores semblent donc jouer un rôle important dans la régulation de la composition de la communauté bactérienne, en terme d'abondance mais plutôt un rôle stabilisateur pour la diversité des proies. Il est important de noter que dans les traitements <10µm, les flagellés bactérivores ne sont pas présents seuls, mais sont accompagnés de formes pigmentées participant à la production primaire et donc au recyclage de la matière organique dans les enceintes expérimentales. Ce facteur peut intervenir également dans l'explication des changements de diversité.

Tableau V-3 : Synthèse des résultats de la variation de la diversité des bactéries hétérotrophes entre 0 et 96 heures au cours de deux expériences *in situ* de fractionnement (<2 et <10 µm) et d'enrichissement (E) au mois de mai et d'avril dans le Léman.

		Fraction <2 µm		Fraction <10 µm	
Avril	Type de traitement	NE	E (+27%)	NE	E (+57%)
	Evolution de la diversité*	-	-	-	-
	Différences de bandes**	(-13)	(-14)/(+1)	(-8)/(+3)	(-10)/(+1)
Mai	Type de traitement	NE	E (+11%)	NE	
	Evolution de la diversité*	=	=	+	
	Différences de bandes**	(+2)/(-1)	(0)	(+3)	

NE : Enceinte non enrichie en virus

E (X%) : Enceinte enrichie en virus, accompagnée de la valeur du pourcentage d'enrichissement

*Tendance de l'évolution de la diversité après 96 heures : augmentation (+), diminution (-), stabilité (=)

**Variations du nombre de bandes sur gel DGGE après 96 heures d'incubations

Pour affiner notre interprétation, et illustrer les données acquises, une analyse des profils DGGE (matrice présence/absence des bandes obtenues) a été effectuée au moyen de l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC). Les représentations graphiques (projection graphique des 2 facteurs permettant d'extraire le maximum de variance) permettent d'illustrer les résultats commentés ci-avant. Elles permettent notamment de visualiser très clairement la

forte modification de structure des communautés entre T0 et T96h au cours de l'expérimentation réalisée en avril, modification forte observée pour tous les types de traitements. La représentation graphique de l'AFC effectuée pour la seconde expérimentation en mai permet de faire une distinction plus nette entre l'évolution des traitements $<2\ \mu\text{m}$ et $<10\ \mu\text{m}$ qui s'individualisent à T96h. La fraction $<10\ \mu\text{m}$ non enrichie en virus est, comme nous l'avons précisé auparavant, caractérisée par une augmentation de la diversité (nombre de bandes accru de +3). Par ailleurs, on note la position, sur le graphique AFC, des traitements <2 enrichis en virus, qui sont marqués par une évolution relativement faible des profils par rapport aux profils initiaux obtenus à T0.

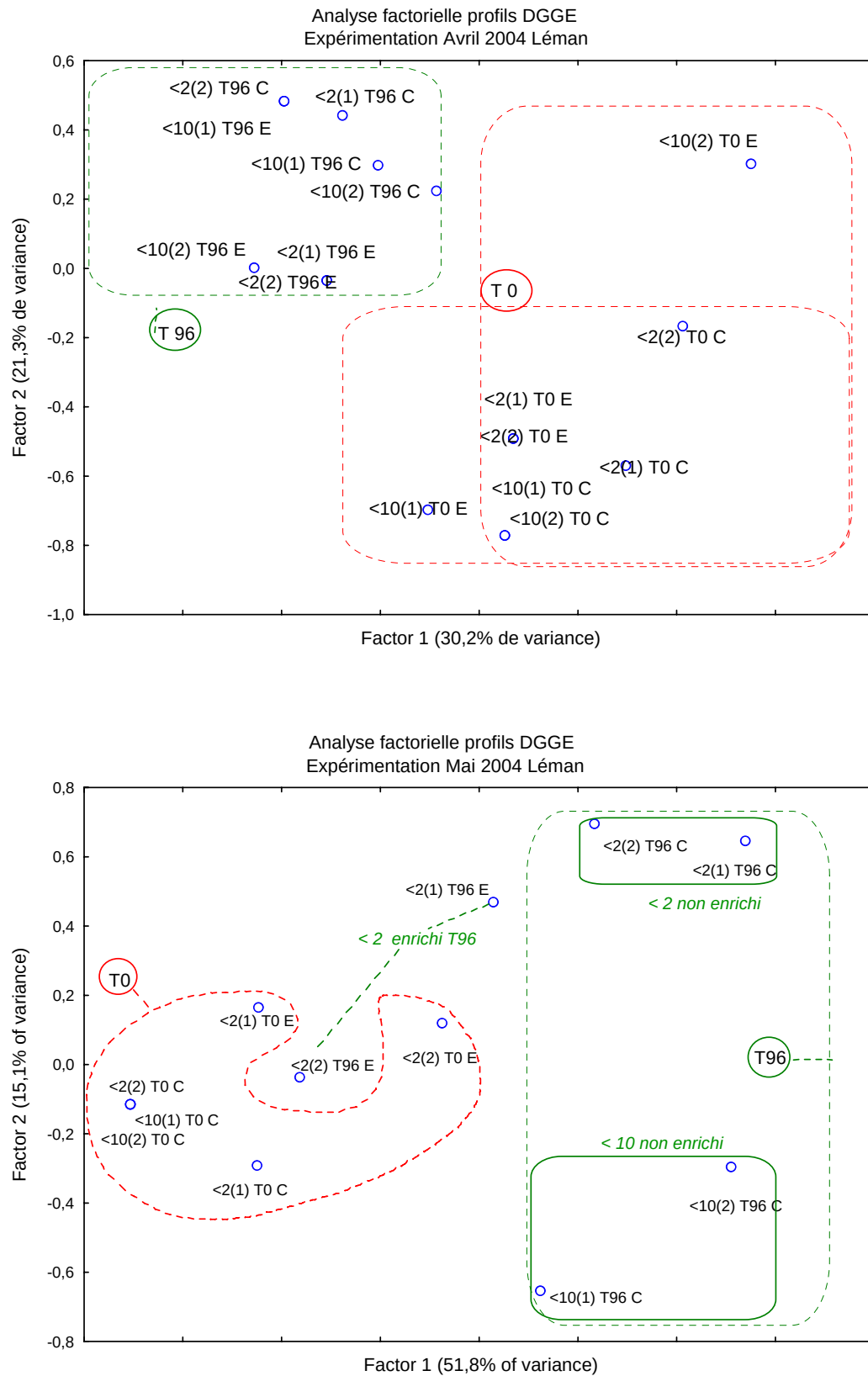


Figure V-1 : Résultats de l'analyse factorielle des profils de DGGE obtenus pour les eu-bactéries lors des expériences d'enrichissement et de fractionnement du mois d'avril et mai 2004 dans le lac Léman.

V.3 Synthèse et discussion générale sur l'impact des virus et prédateurs flagellés sur la mortalité et la diversité bactérienne

L'importance quantitative des virus dans les écosystèmes aquatiques a soulevé un certain nombre de questions au sujet de leur impact sur la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens. Un des points essentiels a été de connaître l'importance relative de la lyse virale et de la prédation des protistes bactériivores, dans les processus de perte affectant les communautés bactériennes. En effet, la compréhension du réseau trophique microbien nécessite la mesure et la distinction de ces deux sources de mortalité car les conséquences de la mortalité microbienne, engendrée par les prédateurs et les virus, sont différentes sur les flux de matière et d'énergie (Bratbak *et al.* 1994, Wetzel 2001). Compte tenu de la complexité des interactions possibles entre les virus et les prédateurs, (i) consommation des virus par les prédateurs (Suttle & Chen 1992, Gonzalez & Suttle 1993, Maranger *et al.* 2002, Bettarel *et al.* 2005), (ii) infection virale des prédateurs (Garza & Suttle 1995), (iii) amplification de la lyse virale par la présence des prédateurs (Simek *et al.* 2001, Weinbauer *et al.* 2003, Jacquet *et al.* en révision, Weinbauer *et al.* 2007), il est important d'appréhender conjointement la prédation et la lyse virale dans la mesure de la mortalité microbienne. Ainsi nous avons utilisé une modification de la technique de dilution de Landry & Hassett (1982) afin de mesurer simultanément ces deux processus à différentes périodes de l'année et dans les trois lacs péri-alpins.

Un autre point essentiel soulevé par les fortes abondances virales, a été de mesurer, non plus l'impact des prédateurs et des virus sur l'abondance des communautés microbiennes, mais sur leur composition. Cette régulation de la diversité, mise en forme notamment par la théorie du « *Killing the winner* » (Thingstad & Lignell 1997), a été démontrée et discutée dans un certain nombre de travaux Van Hannen *et al.* (1999), Lebaron *et al.* (1999), Riemann *et al.* (2000), Schwalbach *et al.* (2004), Hewson & Fuhrman (2006), Bouvier & del Giorgio (2007), et nous avons réalisé une étude préliminaire concernant ce point.

V.3.a La méthode de dilution pour mesurer la prédation et la lyse virale sur les communautés microbiennes

Des travaux de Landry & Hassett (1982) à ceux de Agis *et al.* (2007) la méthode de dilution a été souvent utilisée et modifiée pour estimer de manière simple et rapide la prédation du zooplancton sur le phytoplancton. L'impact des différents groupes

zooplanctoniques exerçant une prédation sur diverses gammes de taille du phytoplancton (micro à pico) a été appréhendé par cette technique au sein de différents écosystèmes (Tableau V-4). Evans *et al.* (2003) ont proposé une adaptation originale de cette technique pour mesurer en plus de la prédation zooplanctonique l'impact lié à la lyse virale. Les auteurs (Evans, Archer, Jacquet & Wilson) ont pu valider la méthode sur un picoeucaryote autotrophe, *Micromonas pusilla*, mais pas sur les communautés procaryotiques. Plus récemment, Baudoux *et al.* (2006) ont utilisé la même approche, également sur un organisme phytoplanctonique : *Phaeocystis globosa*. Les trois études réalisées sur les lacs péri-alpins ont donc constitué les premiers travaux de l'utilisation de la méthode de dilution, pour mesurer la prédation et la lyse virale, sur les bactéries hétérotrophes. Les travaux réalisés en 2003 (Jacquet *et al.* 2005) et en 2004 (Duhamel *et al.* 2006) constituent donc pour le moment les références bibliographiques comparatives de toutes les nouvelles études sur le sujet. Compte tenu de ces considérations, il a donc été important au cours des trois études de regarder d'un œil critique et discuter cette approche méthodologique.

La technique de dilution initiale repose sur deux suppositions majeures: (i) les taux de mortalité du plancton dus à la prédation doivent être proportionnels à la dilution de l'abondance des prédateurs (Landry *et al.* 1995), (ii) la croissance du plancton est exponentielle et indépendante du facteur de dilution (Landry 1993). La première supposition indique implicitement que l'abondance des prédateurs ne doit pas changer durant l'expérience, permettant de conserver la dilution initiale des prédateurs. Si cette supposition a pu être vérifiée pour les prédateurs dans les expériences conduites dans les trois lacs péri-alpins, elle n'a aucun sens pour les virus sur des échelles de temps court si de fortes activités lytiques ont lieu. En effet, la lyse virale se traduit par la multiplication dans la cellule suivie de la dissémination des virus dans l'environnement, ce qui a pour conséquence de largement modifier la quantité de virus présents dans l'environnement (et donc l'échantillon). Ainsi la modification des dilutions initiales en virus au cours du temps n'a pas été retenue comme un critère d'exclusion des valeurs mesurées. Cependant, afin de limiter les dérives par rapport à la technique initiale et de conserver une situation représentative du contexte *in situ*, des temps d'incubation de courte durée (24 ou 48 heures) ont été choisis. Ce choix est également renforcé par le risque d'effet de confinement engendré par l'incubation dans des enceintes de faible volume (250 à 500 ml), susceptible de modifier la diversité et le comportement des communautés microbiennes (Samuelsson & Anderson 2003). La seconde supposition indique implicitement que les communautés planctoniques doivent être caractérisées par un état de croissance exponentielle et donc ne doivent pas être limitées par la disponibilité des

nutriments ou par d'autres facteurs. Andersen *et al.* (1991) ont proposé d'enrichir les microcosmes en éléments nutritifs. Ce principe de placer les communautés en état artificiel de croissance exponentielle, va à l'encontre du cycle de vie des virus car l'activité lytique est étroitement liée au métabolisme des cellules hôtes (Weinbauer 2004). Ainsi, aucune modification expérimentale du métabolisme des cellules hôtes n'a été envisagée dans les expériences réalisées afin de conserver une situation représentative des conditions initiales. De plus, une croissance exponentielle des communautés microbiennes pour déterminer la lyse virale ou la prédation n'a pas semblé être une condition obligatoire pour l'obtention de résultats. En effet, en période de diminution de l'abondance (« décroissance ») des communautés comme au mois d'octobre pour le Léman et le lac du Bourget, l'impact des prédateurs et des virus a pu être mesuré. La dilution successive des prédateurs et des virus a significativement réduit la diminution d'abondance enregistrée, remplaçant même parfois les communautés dans un état de croissance cellulaire. Les deux suppositions sur lesquelles la technique initiale de dilution de Landry *et al.* (1993, 1995) repose ont donc du être remaniées et adaptées à la mesure de la lyse virale sur les communautés microbiennes : (i) l'activité métabolique des cellules hôtes ne doit pas être nulle, (ii) les temps d'incubation des expériences doivent être adaptés en fonction des temps de génération cellulaire.

Malgré ces adaptations et reformulations, des situations particulières au cours de notre étude nous ont obligé à nous interroger sur l'utilisation de cette technique pour mesurer la prédation et la lyse virale sur les communautés procaryotiques. En effet, la validation des mesures de la lyse et de la prédation est fonction de la significativité statistique de la régression linéaire établie entre la dilution et les taux de croissance de la communauté microbienne étudiée. Dans de nombreux cas, cette significativité n'a pas été mise en évidence (voir chapitre V.3.b). Compte tenu de l'absence de significativité des régressions dans des conditions particulières (pour les expériences menées au lac d'Annecy) et à certaines périodes de l'année (en hiver et au début du printemps pour les autres lacs), nous avons proposé deux types possibles d'explication : (i) des problèmes méthodologiques et l'impossibilité d'appliquer la technique de dilution dans certains cas, (ii) l'absence réelle d'activité virale et/ou de prédation. Dans le premier cas de figure, les conséquences de la dilution et les étapes de filtration ont été largement suspectées (Personnic *et al.* soumis) :

- la dilution des communautés a pu diminuer la probabilité de rencontre entre les virus et leurs cellules hôtes et donc empêcher ou minimiser (masquer) la lyse virale. Cette critique a pu cependant être partiellement écartée en analysant finement les concentrations des différentes dilutions aux différentes périodes de

l'année ;

- la dilution a pu contribuer à l'augmentation des périodes de latence des virus au sein de leurs cellules hôtes, comme cela a été proposé par Abedon *et al.* (2003) ;
- la filtration sur 0,2 μm a largement éliminé les virus VLP4 empêchant donc d'apprécier le rôle de ces virus sur les communautés micro-algales ;
- la filtration sur 11 μm a masqué la prédation exercée par des prédateurs ciliés ou metazooplanctoniques, typiquement sur les picocyanobactéries.

La seconde hypothèse a pu aussi être confirmée dans certains cas, eu regard des données du suivi écosystémique pour chacun de ces lacs. Il était possible en effet d'observer l'absence potentielle de prédation et/ou de lyse virale sur les bactéries hétérotrophes et les picocyanobactéries à certains moments de l'année (voir chapitre V.3.b).

Tableau V-4 : Valeurs de prédation mesurées sur différentes communautés par la méthode de dilution de Landry & Hassett (1982).

Proies / Prédateurs	Site	Broutage par les prédateurs (% par Jours)	Reference
Phytoplancton / Prédateurs	Atlantique (USA- Washington)	17-52%	Landry & Hassett 1982
	Pacifique (Hawaii)		Landry <i>et al.</i> 1984
	Celtic Sea and Carmarthen Bay	13-65%	Burkill <i>et al.</i> 1987
	Atlantic arctic	8-15%	Paranjape 1987
	Atlantique (Halifax- Canada)	0-38%	Gifford 1988
	Rivière Rhode (Maryland- USA)	19-100%	Gallegos 1989
	Fjord (Norvege)	0-100%	Andersen <i>et al.</i> 1991
	Pacifique (subarctic)	0-60%	Strom & Welschmeyer 1991
	Pacifique equatoriale	80% (surface)	Landry <i>et al.</i> 1995
		34% (milieu zone euphotique)	
		22% (zone euphotique inférieure)	
	Mer Arabique	26%	Reckermann & Veldhuis 1997
	Mer Arabique	60%	Landry <i>et al.</i> 1998
	Mers des sargasses	<i>Synechococcus</i> : 0-33%	Lessard & Murrell 1998
	Pacifique (sub)arctic	0-64%	Rivkin <i>et al.</i> 1999
		<i>Synechococcus</i> : 19-54%	
	Atlantique Nord (sub topical)	<i>Prochlorophyte</i> : 40%	Kuipers & White 2000
	Mers des sargasses / Pacifique (Californie)	<i>Prochlorococcus</i> : 41%	Worden & Binder 2003
		<i>Synechococcus</i> : 33%	
	Région Océanique	39%	Calbet & Landry 2004 (Synthese Bibliographique)
	Région Cotière	40%	
	Estuaires	53%	
	Région Tropicale	50%	
	Région Tempérée	41%	
	Région Polaire	16%	

V.3.b Importance de la lyse virale et de la mortalité des communautés microbiennes des trois lacs péri-alpins

Les estimations de prédation et de lyse virale mesurées au cours des années 2003, 2004, 2005 et 2006 ont largement démontré la variabilité de ces deux causes de mortalité sur les communautés procaryotiques (Tableaux V-3). Après avoir exploré les possibles liens avec des biais méthodologiques, nous avons pu dégager et confirmer certaines caractéristiques temporelles de cette variabilité. Les périodes estivales et printanières présentent très clairement les plus fortes valeurs de prédation et de lyse sur les bactéries hétérotrophes et les picocyanobactéries en liaison généralement avec de fortes concentrations cellulaires ou particulières. A l'inverse en hiver, aucun impact n'est mis en évidence par la méthode de dilution, quelque soit le lac considéré, laissant penser que la température (et l'activité physiologique des communautés qui en découle) est un facteur clef.

Absence de lyse virale en hiver et dans le système oligotrophe

Les températures faibles en hiver sont assez largement responsables directement et indirectement de la faible activité métabolique des bactéries hétérotrophes, augmentant considérablement le temps de génération des virus dans la cellule hôte. Ainsi nos expériences de dilution menées sur 48 heures ont pu ne pas être suffisamment longues pour visualiser l'effet des virus sur la dynamique bactérienne. Nos travaux semblent confirmer les hypothèses d'Abedon *et al.* (2003) qui ont pu démontrer que les virus en période de faible abondance bactérienne (comme en hiver dans notre étude) pouvait augmenter leur période de latence intra-cellulaire et donc présenter des cycles lytiques plus longs. La faible concentration en éléments nutritifs et plus précisément la faible concentration en P dans le lac d'Annecy (voir chapitre IV.2), par rapport aux deux autres lacs mésotrophes, a probablement également représenté un frein pour la production bactérienne ce qui pourrait expliquer en partie des cycles lytiques viraux plus longs, et par voie de conséquence l'absence de mesure de lyse virale significative durant toute l'année dans ce lac par la méthode de dilution. Bongiorno *et al.* (2005) ont indiqué que des conditions oligotrophes peuvent diriger la stratégie de vie des virus, en plaçant les virus en cycle lysogénique et non plus lytique, ce qui expliquerait également l'absence de lyse des communautés procaryotiques dans le lac d'Annecy. En accord avec ces résultats Jiang & Paul (1998), Weinbauer & Suttle (1999), Williamson *et al.* (2002) ont démontré que le cycle lysogénique est considéré comme la meilleure stratégie

d'infection bactérienne dans des écosystèmes caractérisés par une faible production primaire et bactérienne, ce qui est le cas dans le Léman et le lac du Bourget en hiver et le lac d'Annecy toute l'année. Cependant une autre hypothèse sur le cycle de vie des virus a pu être formulée. En effet en analysant la variation conjointe de l'abondance des bactéries et des virus par le VBR, il est possible que le cycle lysogénique ne soit pas l'unique stratégie envisageable pour les virus dans ces conditions particulières. Le maintien d'un VBR élevé en hiver indique que les virus ne disparaissent pas de la colonne d'eau et même qu'ils diminuent moins vite que leurs cellules hôtes. Compte tenu de la rapide dégradation des virus dans la colonne d'eau (Noble & Fuhrman 2000) et le maintien des virus en l'absence de cycle lytique (mesuré par la dilution), nous avons proposé qu'il puisse exister un système alimentant en virus le milieu ambiant. Le cycle chronique, répondant à cette hypothèse et préalablement décrit par (Hofer & Sommaruga 2001) en milieu aquatique, a été envisagé comme une possibilité.

Il est évident que la mesure des activités métaboliques bactériennes ainsi que des mesures de la fraction des virus lysogéniques sont essentielles pour confirmer ou infirmer ces hypothèses et doivent faire l'objet d'un travail complémentaire pour progresser dans la compréhension de l'impact des virus en hiver dans les deux lacs mésotrophes et dans le lac oligotrophe tout au long de l'année. L'utilisation du cycle chronique comme stratégie de vie par les virus pourrait quant à elle faire l'objet d'un travail d'élaboration de techniques pour pouvoir observer et mesurer la production de virus en l'absence de destruction des cellules hôtes par simple diffusion à travers la membrane plasmique ou la formation de vésicules membranaires.

Importance de la lyse virale en été et en automne

La mesure de la lyse des virus et de la prédation des flagellés hétérotrophes en été et en automne dans les deux lacs mésotrophes a permis de mettre en évidence un rôle important de ces deux communautés dans la mortalité des communautés procaryotiques. En 2003, dans le lac du Bourget, en l'absence de prédateurs, de très fortes valeurs de lyse virale (pour certaines supérieures à celle de la prédation appréhendée par l'utilisation de la méthode d'ingestion de billes) ont été mesurées sur les bactéries hétérotrophes. En 2004, la prédation et la lyse virale ont pu être déterminées au début et à la fin du printemps après 5 jours d'incubation et elles expliquaient 31 et 42% de la mortalité des bactéries hétérotrophes dans le lac Léman. En revanche au début du printemps 2006, avec des temps d'incubation beaucoup plus courts, aucune prédation et lyse virale n'ont pu être observées. A la fin du printemps de

cette même année dans le lac Léman, 36,8% de la mortalité des bactéries a été expliquée par les prédateurs et les virus. La fin du printemps a donc marqué la reprise des activités de prédation et de lyse virale mesurable sur les bactéries hétérotrophes. Durant l'été 2006, jusqu'à 71% de la mortalité des bactéries hétérotrophes a pu être expliquée par la prédation et la lyse virale dans le Léman alors que cette valeur n'a pas dépassé 25,1% pour la même période dans le lac du Bourget. En automne la prédation et la lyse dans le Léman et le lac du Bourget ont expliqué respectivement 26,9 et 13,5% de la mortalité. Les prédateurs et les virus ont donc permis d'expliquer conjointement trois fois plus de mortalité en été et deux fois plus en automne dans le Léman que dans le lac du Bourget. La différence observée pour les deux lacs est délicate à interpréter en l'absence de mesure de paramètres comme l'activité cellulaire et la diversité car l'ensemble des paramètres mesurés dans notre étude (abondances microbiennes, paramètres physico-chimiques) n'ont pas divergé significativement entre les deux lacs. Cependant, il est probable que cette différence soit expliquée par une différence de structure des communautés de prédateurs, de virus et/ou des procaryotes. L'impact de la prédation sur la communauté microbienne est étroitement dépendant du mode de nutrition et donc des organismes bactériovores présents (Gonzales *et al.* 1990, Jurgens & Simek 2000, Boenigk *et al.* 2002). En effet dans l'assemblage des flagellés hétérotrophes une certaine diversité de structure peut être repérée, et, au travers des suivis de la dynamique des communautés flagellées effectués sur les 2 lacs, certaines différences ont pu être observées. En effet, les uniflagellés de très petite taille (2 à 5 μm) sont largement plus représentés dans le lac du Bourget, notamment en période estivale. Le pic d'abondance des flagellés hétérotrophes, en été, est caractérisé sur le lac du Bourget par la présence dominante de petits uniflagellés (de taille variant entre 2 et 4 μm) appartenant notamment aux morphotypes *Oikomonas* de position systématique incertaine, mais proches au niveau systématique des Chrysomonadines. Il s'agit de taxons considérés comme étant essentiellement bactériovores. Différemment, pour le Léman, les cellules de type *Katablepharis* qui sont des katablepharidae, algivores et secondairement bactériovores, sont plus largement représentées.

En ce qui concerne la différence de structure potentielle au niveau des communautés procaryotiques, il est à noter que les travaux récents de Dorigo (2006) ont révélé l'absence de différences majeures dans la diversité des communautés procaryotiques (de taille inférieure à 2 μm) dans l'épilimnion des trois lacs péri-alpins. Toutefois, il est possible que la diversité procaryotique des organismes de taille supérieure à 2 μm , typiquement les bactéries filamenteuses, a pu jouer un rôle dans la variabilité de prédation et de lyse virale dans les deux lacs. Quoi qu'il en soit, il semble que les virus puissent jouer

un rôle fonctionnel plus important au Léman que sur les deux autres lacs. Une autre hypothèse envisageable est une différence dans l'état physiologique des cellules procaryotiques. Del Giorgio *et al.* (1996) ont mis en évidence que les bactéries métaboliquement actives subissent une prédation au moins quatre fois plus forte que les bactéries inactives. Les virus, se servant du métabolisme des cellules pour se multiplier et lyser leur hôte, sont donc également étroitement dépendants de l'état physiologique des cellules procaryotiques.

Tableau V-5 : Part relative (%) de la lyse virale et de la prédation par les flagellés hétérotrophes dans la mortalité des bactéries hétérotrophes par trois approches expérimentales de dilution dans trois lacs péri-alpins (Léman, Bourget, Annecy) en 2003, 2004, 2005 et 2006.

				Septembre / Octobre	Janvier	Mars / Avril	Mai	Juillet / Août
2003	Exp. A	Bourget	Lyse			60,3*	34,6*	51,8*
			Prédation			1,9**	4,8**	7,8**
2004	Exp. B	Léman	Prédation + Lyse			31***	42***	
			Prédation				32***	
2005	Exp. C	Léman	Prédation + Lyse	26,9	Ns	Ns	36,8	71,0
			Prédation	42,2	Ns	Ns	37,3	76,5
		Bourget	Prédation + Lyse	13,5	Ns	Ns		25,10
			Prédation	18,2	Ns	Ns		56,83
2006		Annecy	Prédation + Lyse	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
			Prédation	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

* Expériences en l'absence de prédateurs

** Mesure par méthode d'ingestion de billes fluorescentes

*** Temps d'incubation de 5 jours

Ns : Régression linéaire non significative

En ce qui concerne les picocyanobactéries, les prédateurs n'ont pas semblé être un facteur explicatif majeur de mortalité dans les trois lacs. Toutefois, l'impact des prédateurs d'une taille supérieure à 11 μm , comme les ciliés, n'a pas été considéré. Or, de nombreux travaux comme ceux de Pernthaler *et al.* (1996), Verni & Gualtieri (1997), Callieri *et al.* (2002), Comte *et al.* (2006) ont suggéré ou prouvé que les ciliés et le métazooplancton peuvent être les prédateurs majoritaires des picocyanobactéries. La lyse virale a en revanche permis d'expliquer en automne 9,8% et 7,6% de la mortalité des picocyanobactéries dans les lacs Léman et du Bourget (valeur typique rapportée par Suttle 2000), contribuant significativement à la terminaison de leur « bloom » annuel (voir chapitre IV.2). En revanche, en été, les virus dans les trois lacs ont semblé jouer un rôle favorable sur la croissance des picocyanobactéries. Nous pensons que cet effet positif puisse être lié aux processus de redistribution des nutriments organiques et minéraux faisant suite à la lyse de certaines populations bactériennes, mais ceci reste à démontrer.

Tableau V-6 : Part relative (%) de la lyse virale et de la prédation par les flagellés hétérotrophes dans la mortalité des picocyanobactéries par une approche expérimentale de dilution dans trois lacs péri-alpins (Léman, Bourget, Annecy) en 2005 et 2006.

			Septembre / Octobre	Janvier	Mars / Avril	Mai	Juillet / Août
2005	Exp. C	Léman					
		Prédation + Lyse	16,7	Ns	Ns	Ns	-31,5
		Prédation	6,9	Ns	-85,9	-9,4	Ns
		Bourget					
2006		Prédation + Lyse	7,6	Ns	Ns		-22,5
		Prédation	Ns	Ns	Ns		Ns
		Annecy					
		Prédation + Lyse	Ns	Ns	Ns	Ns	-49,3
		Prédation	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

Ns : Régression linéaire non significative

L'impact relatif des prédateurs considérés seuls a été généralement supérieur à celui des prédateurs et virus sur la mortalité des bactéries hétérotrophes. La présence des virus a donc semblé avoir un effet positif sur les taux de croissance des bactéries. Ce type de résultats a préalablement été décrit par Fuhrman (1992), Middelboe *et al.* (1996), Gobler *et al.* (1997), Middelboe (2000), Weinbauer (2004), Middelboe & Jorgensen (2006). Ces auteurs ont suggéré que les produits de la lyse virale comme les contenus cellulaires ou les fragments de membranes pourraient entrer dans le réservoir de matière organique de la colonne d'eau et être exploités plus efficacement par les bactéries (Gobler *et al.* 1997), avec pour conséquence une stimulation de la production et une augmentation des abondances bactériennes. De manière identique, un effet positif sur les picocyanobactéries a pu être observé, suggérant que le recyclage des nutriments lié à l'action virale a été également un élément favorable pour le picophytoplancton. Ainsi dans l'ensemble de nos études, les virus ont pu avoir une action bénéfique sur la croissance de certaines bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries en favorisant leur développement au printemps et en été. Néanmoins, comme cela a pu déjà être mis en évidence pour *Emiliana huxleyi* (Jacquet *et al.* 2002), les virus semblent impliqués dans la terminaison du bloom des picocyanobactéries en automne dans les lacs Léman et du Bourget.

Depuis les premiers travaux de Fuhrman & Noble en 1995, une quinzaine d'études ont analysé conjointement l'effet de la prédation et de la lyse virale (Tableau V-2). Les mesures réalisées ont rapporté des valeurs de prédation et de lyse virale pouvant expliquer individuellement de 0 à 100% de la mortalité bactérienne ou dit autrement l'existence d'une grande variabilité de prédation et de lyse entre différents écosystèmes (Tableau V-2, Bettarel *et al.* 2004) ou au sein d'un même écosystème (Steward *et al.* 1996, Guixa-Boixereu *et al.*

1996, Guixa-Boixereu *et al.* 1999, Simek *et al.* 2001, Almeida *et al.* 2001, Fischer *et al.* 2006). Deux études (Weinbauer & Hoffle 1998, Bettarel *et al.* 2003) ont enregistré une prédominance de la lyse virale sur la prédation avec l'augmentation de la profondeur. Cette prédominance de la lyse virale avait aussi été mesurée par Fischer & Velimirov en 2002, dont l'étude indiquait une lyse virale 11 fois supérieure à la prédation dans le Lac Alte Donau (Autriche). Par la technique de dilution, en 2003 dans le lac du Bourget nous avons pu enregistrer un impact de lyse supérieur à celui des prédateurs mais le protocole expérimental utilisé ne permettait pas de conclure de manière sûre sur ce fait (Tableau V-3). Dans les études ayant suivi pour trois lacs péri-alpins, entre 2004 et 2006, ainsi que dans toutes les autres études référencées dans le Tableau V-2, la prédation a en fait toujours été supérieure à la lyse virale dans l'explication de la mortalité bactérienne. Une tendance semble donc se dégager, même si la comparaison de nos résultats avec la littérature doit être considérée avec précaution tant il est vrai que les techniques utilisées par les uns et les autres sont différentes.

Il n'existe pour le moment aucune technique standardisée pour évaluer la mortalité des communautés microbiennes imputable à la lyse virale. Pour mesurer la prédation, les chercheurs ont utilisé : le principe de l'ingestion de bactéries fluorescentes (FLB), des microsphères fluorescentes (FMS) et les mesures de taux de filtration (TF). Pour les virus, les auteurs ont majoritairement utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) pour estimer les taux d'infection mais également le potassium cyanide (KCN) comme inhibiteur du métabolisme bactérien et l'incorporation de thymidine tritiée comme radiotraceur. Toutes ces techniques possèdent des biais méthodologiques, dont il est difficile de se départir. Par exemple, pour la MET, la mesure de la mortalité des bactéries engendrées par les virus correspond à la mesure du nombre de virus visibles dans les cellules, converti en nombre de virus réellement présents, valeur multipliée par un facteur de conversion établi par Binder (1999). Cette méthode, utilisant la MET, extrapole donc le nombre de virus présents à l'état intracellulaire à un pourcentage de perte de la production bactérienne. Compte tenu des nouvelles données concernant les cycles viraux et notamment les cycles lysogéniques (Ackerman & Dubow 1987, Jiang & Paul 1994, 1998, Wilson & Mann 1997, Ortmann *et al.* 2002, Williamson *et al.* 2002, Weinbauer 2004), l'extrapolation de la présence intra cellulaire des virus en mortalité bactérienne induite par les virus (*i.e.* cycle lytique) pourrait être largement rediscutée dans l'avenir. De la même façon l'utilisation de FLB, FMS et les taux de filtration (Pace & Bailif 1987, Sherr & Sherr 1993, Carrias *et al.* 1996) ne sont pas forcément transposables d'un écosystème à l'autre ou à la diversité des prédateurs présents (Guixa-

Boixereu *et al.* 1996). Les différentes études expriment également l'impact sur les bactéries de manières différentes. Il peut s'agir d'une mesure du % de perte de la production bactérienne pour la majorité d'entre elles, mais également d'une mesure du % de perte du stock de bactéries présentes. De plus, lorsque l'estimation concerne un pourcentage de la production bactérienne, dans le cadre de comparaison d'études, il est important de s'assurer que le même type de protocole d'estimation de la production bactérienne est utilisé (Fuhrman & Azam 1982, Riemann & Sondergaard 1986, Kirchman 1993, Kirchner & Velimirov 1999, Wieltchnig *et al.* 2003...); des protocoles différents (incorporation thymidine, leucine, fréquence des cellules en division) pouvant être plus délicats à comparer.

Les nombreux biais méthodologiques inhérents à chaque technique nous ont conforté dans l'idée d'utiliser une seule technique permettant d'évaluer simultanément la prédation et la lyse virale, afin de contraindre ces mesures aux mêmes dérives méthodologiques. La technique de dilution a donc permis de contourner un grand nombre de difficultés méthodologiques en mesurant directement l'impact de la prédation et de la lyse virale sur le stock bactérien et a également autorisé une comparaison saisonnière, temporelle et inter-écosystème de ces impacts. Cependant, à l'issu de nos travaux, il apparaît que certains points clés restent à clarifier ou à modifier suivant les questions posées. Compte tenu de l'absence des prédateurs d'une taille supérieure à 11 μm dans notre « design » expérimental, il a été difficile d'appréhender au sein d'une même expérience la mortalité des bactéries hétérotrophes et celle des picocyanobactéries (et éventuellement d'autres organismes de taille plus grande). Les principaux prédateurs de ces 2 groupes procaryotiques n'appartenant pas aux mêmes fractions de taille, il aurait été utile de considérer une fraction de taille supplémentaire (contenant les ciliés notamment). Pour l'utilisation de la technique de dilution sur la mortalité des organismes procaryotiques, il est donc possible de préconiser deux expériences séparées, avec l'utilisation d'une fraction constituée pour isoler le microzooplancton pour apprécier efficacement l'impact des prédateurs supérieurs (dont les ciliés) sur les picocyanobactéries (et peut être sur les petits eucaryotes autotrophes); et par ailleurs, l'utilisation d'une eau filtrée sur 11 μm (dans notre cas) pour apprécier celui des flagellés hétérotrophes sur les bactéries hétérotrophes. D'autre part, nous attirons l'attention sur le fait que, dans ces approches utilisant des filtrations pour constituer les différentes fractions de taille, des pertes de certains groupes viraux ont été observés et doivent être anticipées pour des expériences à venir. En effet, en considérant les différents groupes viraux identifiés en cytométrie en flux et l'impact de la filtration (0,2 μm) sur les VLP4 (80% de

perte), il n'était pas envisageable d'appréhender l'impact des virus sur les communautés eucaryotiques autotrophes. Utiliser une eau brute conservant l'ensemble des communautés planctoniques et travailler avec de l'eau filtrée à travers 0,45 μm (avec le risque néanmoins de contamination bactérienne) pourraient surement permettre d'apprécier le rôle des virus eucaryotes.

Enfin, les expérimentations conduites dans les trois lacs se sont focalisées sur la couche supérieure de l'épilimnion et il est évident que la répétition de ces approches expérimentales serait pertinente au niveau des couches profondes pour appréhender la variabilité spatiale de la prédation et de la lyse virale sur les communautés procaryotiques (voir chapitre VI).

Tableau V-7 : Valeurs de prédation et de lyse virale dans l'explication de la mortalité bactérienne (par jour) dans les études ayant mesurées simultanément ces deux processus.

Site	Prédation		Lyse		Reference
	Méthodes	% de perte par jours	Méthodes	% de perte par jours	
Pacifique (USA-Californie)	FLB	37,63-45,75% pb	RT	29,25-33,37%	Fuhrman & Noble 1995
Mer Adriatique Nord					Weinbauer & Peduzzi 1995
Artic-Mer Chukchi	TF	0-125% pb	MET	2-36% pb	Steward <i>et al.</i> 1996
			RT	1,9-12% pb	
Delta de l'Ebre (Espagne)	FLB	15-50% pb	MET	2-10 pb	Guixa-Boixareu <i>et al.</i> 1996
	TF	81,8-108% pb epilimnion	MET	7,7-27,8% pb épilimnion	
Lac Plubsee (Allemagne)	TF	2,9-27,6% pb metalimnion	MET	19,6-46,8% pb métalimnion	Weinbauer & Hoffle 1998
	TF	5-8,9% pb hypolimnion	MET	38,4-97,3% pb hypolimnion	
Méditerranée (Espagne)	FLB	10-60% pb	KCN	5-100% pb / 3-20% sb	Guixa-Boixareu <i>et al.</i> 1999
Réservoir Rimov (Rep. Tchèque)	FLB	50% pb	MET	17-37% sb / 25% pb	Tuomi & Kuppo 1999
Estuaire de Ria de Aveiro (Portugal)	FD	69-73% sb	FD	36-61% sb	Simek <i>et al.</i> 2001
Lac Alte Donau (Autriche)				55,7-62,7% pb	Almeida <i>et al.</i> 2001
Lac Pavin (France)	TF	0,5-115,4% pb	MET	3,5-10,3% pb épilimnion	Fischer & Velimirov 2002
	TF	0,7-97,5 % pb	MET	6-33,7% pb métalimnion	Bettarel <i>et al.</i> 2003
Réservoir Rimov (Rep. Tchèque)	FLB	24-66% pb	MET	18-66% pb	Weinbauer <i>et al.</i> 2003
Réservoir de la Sep (France)	TF	0,1-96,7% pb	MET	1-60% pb	Pradeep Ram <i>et al.</i> 2005
Lac Pavin (France)	FMS	40,4% pb	MET	16,2% pb	Bettarel <i>et al.</i> 2004
Lac Aydat (France)	FMS	27,3% pb	MET	19% pb	Bettarel <i>et al.</i> 2004
Lac Oxbow (Autriche)- Sédiment	FLB	1% pb	KCN	12% pb	Fischer <i>et al.</i> 2006
					Wells & Deming 2006
Reservoir Rimov (Rep. Tchèque)	FLB	5-6 10 ⁶ bacteries.ml ⁻¹ .jours ⁻¹	MET	16% pb	Weinbauer <i>et al.</i> 2007

SB: stock bactérien, pb: production bactérienne, TF: Taux de Filtration, FMS: Fluorescent Microspheres, FLB: Fluorescent Labelled Bacteria, MET: Microscopie électronique transmission, FD: Filtration différentielle en microcosmes, VD: Viral Decay, RT: Radio traceur (thymidine)

V.3.c Effet de la lyse virale et de la prédation sur la diversité des bactéries hétérotrophes du lac Léman

Les deux expériences de fractionnement/enrichissement conduites dans le Léman (voir chapitre V-2) nous ont permis d'appréhender l'effet structurant de la pression de prédation et de la lyse virale sur la diversité procaryotique. L'effet « négatif » sur la diversité, suite à l'isolement des communautés bactériennes, semble expliqué principalement par des conditions limitantes en ressources et une faible activité métabolique à cette période. Dans la fraction de taille $<2\ \mu\text{m}$, les conditions limitantes en ressources ont été amplifiées au fil de l'incubation, par l'absence (ou la faible présence) d'organismes photosynthétiques dont on connaît le rôle clé dans l'excrétion de matières organiques assimilables pour les bactéries hétérotrophes. Ces conditions limitantes ont sans doute été la source de modifications des phénomènes de compétition entre les souches bactériennes et ont conduit au maintien des seules souches capables de faire face à ces conditions limitantes. Ce phénomène de perte de diversité et de modification de structure de la communauté bactérienne dans les enceintes $<2\ \mu\text{m}$ a d'ailleurs été particulièrement net durant l'expérience menée en avril pour laquelle les conditions de ressources initiales étaient relativement faibles, l'élimination des organismes autotrophes ayant pu avoir un effet accentuant cela. A une échelle de temps relativement courte, de l'ordre de la journée, des études conduites en milieu marin et d'eau douce ont pu montrer que la disponibilité des ressources affectait en effet la composition de la communauté bactérienne (Hofle 1992, Donner *et al.* 1996, Pinhassi *et al.* 1999). La variation de la qualité et de la quantité des substrats organiques en fonction de leur origine (algues, cyanobactéries, organismes zooplanctoniques, apports allochtones), ainsi que les différentes capacités d'utilisation de diverses classes de substrats organiques carbonés ont été identifiés comme des éléments affectant la diversité procaryotique (Van Hannen *et al.* 1999, Grover & Chrzanowski 2000). Dans cette première expérience, les ressources nutritives ont donc probablement été déterminantes dans la modification de la diversité des bactéries hétérotrophes. Toutefois, la perte de diversité a été significativement limitée par la présence des flagellés hétérotrophes et pigmentés, à l'instar des observations obtenues à l'issue de la seconde expérimentation. En effet, en mai, la tendance générale a plutôt été celle d'une stabilité du nombre de bandes révélée par DGGE (traitements $<2\ \mu\text{m}$) ou une augmentation de la diversité en présence des bactérivores et petits autotrophes. La modification de la diversité des bactéries hétérotrophes en lien avec les prédateurs, plus précisément les flagellés hétérotrophes, a pu être mise en évidence dans de nombreux travaux, notamment ceux de Jurgens *et al.* (1999), Simek *et al.*

(1999), Langenheder & Jurgens (2001), Gasol *et al.* (2002) lors d'expériences *in situ*. Dans notre cas, d'une part, la présence des bactériores était associée à des modifications de structure des communautés procaryotiques, et d'autre part, dans les traitements $<10\ \mu\text{m}$ ces modifications conduisaient toujours à un maintien de diversité ou limitation de perte de diversité par rapport aux traitements $<2\ \mu\text{m}$.

Diverses explications à la modification de structure des communautés ont été proposées notamment en lien avec des stratégies de résistance à la prédation de certaines souches bactériennes. D'après Jurgens *et al.* (1999), lorsque la prédation des « protozoaires » constitue une pression de sélection majeure, des taxa sous représentés peuvent alors devenir dominants notamment via la formation de filaments résistants à la prédation. Le développement de bactéries ayant une motilité plus élevée a également été envisagé (Matz & Jurgens 2003), pouvant constituer une stratégie pour échapper aux prédateurs (Matz *et al.* 2002). Lebaron *et al.* (1999) ont, quant à eux, émis l'hypothèse que la stratégie de résistance de quelques espèces bactériennes pouvait être la production de cellules de grande taille actives et de cellules de petites tailles inactives au cours de chaque division cellulaire.

En ce qui concerne, non plus les modifications de structure, mais le maintien de diversité ou la limitation de perte de diversité que nous avons observé par rapport aux traitements $<2\ \mu\text{m}$, il est probablement lié non seulement à l'effet structurant des bactérivores mais aussi à la présence de pico- et nanophytoplancton assurant le recyclage des éléments nutritifs favorables. On note que l'effet de maintien de la diversité dans les traitements $<10\ \mu\text{m}$ était d'autant meilleur que l'abondance des flagellés pigmentés est élevée. En effet, c'est en avril que le plus net « effet tampon » sur la diversité est observé, alors que les flagellés pigmentés sont particulièrement abondants dans la fraction $<10\ \mu\text{m}$ en comparaison de la fraction $<2\ \mu\text{m}$.

Dans les deux expériences conduites dans le Léman, il n'a pas été mis en évidence de rôle déterminant des virus dans la modification de la diversité bactérienne. L'enrichissement en virus n'a également pas induit de modification spécifique nette de la diversité. De manière assez similaire à la notre, Hornak *et al.* (2005) ont étudié par des expériences *in situ* sur le réservoir Rimov (République Tchèque) l'impact des ressources disponibles, de la prédation et de la lyse virale sur la diversité bactérienne. Ils ont pu mettre en évidence le rôle des prédateurs et des ressources dans la modification de la diversité des bactéries mais ils n'ont pu mettre en évidence de rôle des virus dans cette modification. En revanche, différentes études et notamment celle de Jardillier *et al.* (2005) en milieu lacustre (Lac Pavin, France) ont identifié les virus comme responsables de changements significatifs dans la composition de la

communauté procaryotique et les prédateurs comme agents de contrôle de l'abondance bactérienne. L'utilisation du principe de l'enrichissement des enceintes expérimentales en virus par Weinbauer & Hofle (1998) ainsi que par Suttle (1992) leur a également permis de mettre en évidence un effet de la lyse virale sur la composition bactérienne pour les premiers et sur les producteurs primaires (notamment les cyanobactéries) pour le second. Comme cela a été démontré par l'approche écosystémique et l'approche expérimentale (méthode de dilution), la variabilité de l'abondance et de l'action lytique des virus est extrêmement grande au cours du temps laissant largement supposer que leur impact potentiel sur la diversité l'est également. Bien que l'on n'ait pas mis en évidence de régulation de la diversité par les virus au mois d'avril et mai, en accord avec la dynamique virale et leur action lytique, leur rôle sur la diversité est probablement significatif en période de fortes activités cellulaires comme en été. De plus, notons qu'un effet caché existe peut être, action conjointe entre les prédateurs et les virus puisque l'on sait que l'action des virus peut être fortement conditionnée par la présence des prédateurs (Simek *et al.* 2001, Weinbauer *et al.* 2003, Simek *et al.* 2007, Weinbauer *et al.* 2007, Jacquet *et al.* en révision). Un traitement sans virus mais avec flagellés manque donc à notre design expérimental pour donner une meilleure interprétation.

Notons enfin que ces expériences n'ont été effectuées que deux fois, aux mois d'avril et de mai et qu'elles devraient être reconduites à d'autres périodes l'année, en les complétant avec des mesures de qualité et quantité de la matière organique pour tenter d'appréhender de manière plus complète le rôle des virus sur la diversité bactérienne dans le lac Léman et dans les deux autres lacs péri-alpins (lac du Bourget et d'Annecy).

CHAPITRE VI

Conclusion, perspectives

CHAPITRE VI : Conclusions générales et perspectives

Les microorganismes (plus particulièrement les bactéries) jouent un rôle clef au sein des écosystèmes aquatiques. Ils contribuent à la formation de la matière organique via les processus photosynthétiques des cellules eucaryotes autotrophes et des cyanobactéries. Ils assurent la décomposition de la matière organique, associée à la libération de composés inorganiques (ex. CO_2 , NH_4 , CH_4 , H_2) via les processus de minéralisation. Ils servent de source alimentaire à d'autres micro-organismes hétérotrophes comme les protistes (flagellés, ciliés) ou les consommateurs supérieurs (méta-zooplankton, larves de poissons)... Compte tenu de ces nombreux et indispensables rôles et fonctions du compartiment bactérien, il est donc aujourd'hui nécessaire de comprendre l'évolution, le fonctionnement et les interactions de chaque groupe microbien. Par ce travail, nous avons donc contribué à la compréhension de l'évolution spatio-temporelle des virus et de leur(s) rôle(s) au sein du réseau microbien. Les questions que nous avons posées initialement concernaient :

- (1) Les abondances et la distribution des communautés virales dans les lacs péri-alpins.
- (2) Les variations d'abondance des communautés microbiennes dans le temps et l'espace. Le lien entre ces variations et le statut trophique.
- (3) La reproductibilité de la dynamique saisonnière au sein de chaque écosystème situé dans une même éco-région.
- (4) Les liens existant entre les communautés caractéristiques de la boucle microbienne et les paramètres environnementaux.
- (5) Le rôle des virus comme agents de mortalité des communautés et plus particulièrement des bactéries hétérotrophes et ce comparativement à la prédation des flagellés ?
- (6) L'impact potentiel des virus et/ou des prédateurs protistes sur la diversité bactérienne ?

L'utilisation de deux types d'approches (écosystémique et expérimentale) nous a permis de commencer à répondre à l'ensemble de ces questions. En résumé :

- l'approche écosystémique, avec le suivi des abondances des virus, des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries, des petits eucaryotes autotrophes et des protistes hétérotrophes (flagellés et ciliés), a permis d'analyser relativement finement la dynamique des communautés microbiennes dans les trois lacs péri-alpins. Nous avons observé une certaine

stabilité de la dynamique des communautés microbiennes d'une année à l'autre mais également la forte variabilité saisonnière dans les trois lacs péri-alpins. Nous avons révélé des abondances et des dynamiques sensiblement différentes entre les communautés microbiennes des deux lacs mésotrophes (Bourget, Léman) et du lac oligotrophe (Annecy). L'utilisation d'analyses statistiques nous a permis d'expliquer la variabilité des communautés microbiennes et de mettre en avant le rôle fondamental des éléments nutritifs et la plus grande complexité en terme de régulation des communautés microbiennes dans le lac Annecy.

- sans l'approche expérimentale utilisant le principe de la dilution, nous aurions eu beaucoup de difficultés à démontrer le rôle clef des virus et des prédateurs protistes dans la régulation des communautés. Cette approche, complémentaire au suivi écosystémique, nous a donc permis de mettre en évidence un contrôle différent des prédateurs et des virus sur les communautés procaryotiques dans le lac d'Annecy comparativement aux lacs Léman et du Bourget (plus particulièrement en été et en automne). En revanche, l'approche que nous avons décidé d'utiliser n'a pas toujours rendu possible la séparation entre la part de mortalité engendrée par la prédation des flagellés de la lyse virale. En effet, ces derniers, ont été des facteurs majoritairement favorables à la croissance des bactéries, probablement par une remise à disposition d'une qualité de matière organique plus adaptée (issue directement de l'activité lytique). Quant à notre approche expérimentale étudiant l'action virale sur la diversité, elle n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif sur la diversité bactérienne.

Ce travail de thèse aura permis de jeter les bases d'une compréhension assez élevée de la distribution et de la dynamique des communautés microbiennes et notamment des virus dans les trois lacs péri-alpins. Toutefois, à l'issue de ce travail de quelques années, il n'en reste pas moins que de nouvelles questions sont restées sans réponse et que de nombreuses perspectives sont apparues, discutées ci-dessous.

La cytométrie en flux appliquée à l'étude des communautés microbiennes lacustres

Au cours de ces travaux, nous avons pu acquérir un jeu de données très large (plusieurs milliers d'analyses) grâce à l'outil de dénombrement extrêmement performant qu'est la cytométrie en flux (CMF). Nous avons ainsi pu réaliser un suivi bimensuel à 7-8 profondeurs sur les lacs Léman, du Bourget et d'Annecy au cours de quatre années. La CMF nous a permis d'effectuer un dénombrement reproductible, rapide et fiable à la fois des virus, des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries et des eucaryotes autotrophes, ce qui

n'aurait pas été possible par les techniques de dénombrement utilisant la microscopie (MET et MEF). Toutefois, cette technique ne permet pas d'acquérir certains paramètres clefs de l'écologie virale comme la FIC (fréquence d'infection cellulaire) ou le VIBM (% de mortalité de la production bactérienne engendré par la lyse virale). A l'avenir, il serait donc particulièrement intéressant de coupler de manière plus systématique ces deux techniques pour affiner notre compréhension du rôle potentiel des virus (voir plus bas).

Lors de notre étude, nous avons pu repérer à de nombreuses reprises les deux populations bactériennes rapportées dans la littérature et nommées HDNA (pour « High DNA content bacteria ») et LDNA (pour « Low DNA content bacteria ») (Li *et al.* 1995, Button *et al.* 1996, Marie *et al.* 1997, Lebaron *et al.* 2002, Sherr *et al.* 2006). Toutefois, cette discrimination n'était pas systématique si bien que nous n'avons pas cherché à présenter de données partielles sur cet aspect. De plus, d'après Longnecker *et al.* (2005) ou encore Bouvier *et al.* (2007), il semble que l'on ne puisse véritablement attribuer à l'une ou l'autre de ces "populations" un rôle plus actif ou une diversité accrue. Bouvier *et al.* (2007) ont pu démontrer à partir de 640 échantillons collectés dans une large gamme d'écosystèmes (océans, rivières, lacs, estuaires) hyper-eutrophe à ultra-oligotrophe, que la composition des groupes HDNA et LDNA était variable et ne pouvait être réduit à la simple vision dichotomique (couramment utilisée dans la littérature) des HDNA représentant les cellules actives et les LDNA les cellules inactives ou bien la vision selon laquelle les deux groupes seraient constitués de communautés distinctes et indépendantes. Leurs résultats suggèrent un scénario intermédiaire dans lequel il y aurait à la fois des composés spécifiques de chaque groupe mais également des composés non spécifiques qui se déplacent entre les deux groupes HDNA et LDNA. Il n'en reste pas moins qu'il serait intéressant de comprendre pour la communauté bactérienne des lacs péri-alpins l'absence régulière de la distribution bimodale et vérifier en effet que la population HDNA est potentiellement la plus active, la plus diversifiée ou encore celle qui est susceptible de jouer un rôle clef dans le fonctionnement de la communauté.

De la même manière que la cytométrie est aujourd'hui utilisée en routine pour la détermination des abondances des communautés virales, bactériennes, picocyanobactériennes et phytoplanctoniques, il serait intéressant de l'appliquer à l'énumération des protistes hétérotrophes. Très récemment, Zubkov *et al.* (2007) ont montré que cela était possible au moyen d'un cytomètre en flux de paillasse comparable à celui utilisé dans le cadre de cette thèse (FASCSort) et en colorant l'ADN des protistes avec du SYBR Green 1. Dans cette étude, la discrimination des protistes flagellés hétérotrophes a été effectuée en augmentant le débit

de l'appareil jusqu'à 1ml/min et en jouant sur les paramètres d'acquisition cytométriques pour focaliser l'analyse sur les protistes et ne pas perturber la signature cytométrique par la simple présence des bactéries. Ces auteurs ont pu vérifier avec la fonction de tri cellulaire et par EFM qu'il s'agissait bien de protistes. Ils ont pu également discriminer les flagellés pigmentés grâce à leur autofluorescence (FL3). Cependant, il est important de noter que cette technique permettant un gain de temps considérable (jusqu'à 100 fois selon les auteurs) ne permet de travailler qu'à l'échelle de la communauté ou des populations au mieux, obligeant donc de coupler les analyses avec de la microscopie pour obtenir une description détaillée des différentes communautés si nécessaire.

Outre le fait qu'elle ait rendue possible une analyse écosystémique relativement fine (des abondances des communautés virales, bactériennes, picocyanobactériennes et phytoplanctonique) la CMF nous a également permis de discriminer jusqu'à quatre groupes de virus ayant des caractéristiques différentes en terme de fluorescence (du complexe colorant-acides nucléiques) et de diffraction à la lumière (FALS, RALS). Ces groupes (en fait entre 2 et 4 populations) préalablement observés par Marie *et al.* (1999), Chen *et al.* (2001), Li *et al.* (2001), Castberg *et al.* (2001), Larsen *et al.* (2001), Jacquet *et al.* (2002), Larsen *et al.* (2004), Goddard *et al.* (2005) ont déjà été suspectés d'être des bactériophages pour les VLP1, des cyanophages pour les VLP2 et des virus de micro-algues eucaryotes pour les VLP4. Dans notre étude, ces groupes ont représenté en moyenne 92% pour les VLP1, 6% pour les VLP2 et moins de 1% pour les VLP3 et les VLP4, de l'ensemble de la communauté virale. La comparaison des dynamiques de ces différents groupes avec celles des autres communautés microbiennes analysées dans les trois lacs péri-alpins a généralement permis de renforcer ces relations supposées d'hôtes-parasites. Toutefois les analyses statistiques ne nous ont pas permis de confirmer l'exacte association d'un groupe de virus avec telle ou telle communauté. Par exemple, il existe globalement une bonne superposition de la dynamique des VLP2 et VLP4 avec respectivement les picocyanobactéries et les petits eucaryotes à l'échelle de l'année. Toutefois, certaines périodes de l'année échappent à cette règle et le lien entre les deux communautés s'atténue. Plusieurs raisons ont été envisagées pour expliquer cela. La multiplication des virus en réponse au développement de leurs cellules hôtes a pu se faire avec un léger décalage dans le temps rendant les statistiques inefficaces pour mettre en évidence une relation étroite date à date. Nos résultats ont souligné l'importance d'étudier ces communautés à de grandes échelles de temps mais également de s'intéresser dans l'avenir à des pas de temps beaucoup plus courts, de l'ordre de la journée ou de quelques heures, comme cela a été rapporté par Bettarel (2002). En effet, des analyses réalisées à des pas de

temps courts permettraient de visualiser d'éventuels décalages dans la dynamique des hôtes et des groupes viraux et d'améliorer la compréhension des relations entre les différents groupes.

A l'issue de nos travaux, il n'est pas encore possible d'associer sans ambiguïté une signature virale telle qu'observée en CMF avec un groupe d'hôtes en particulier. Il est fort à parier que chaque groupe de virus représente un ensemble assez large de différents types de virus et qu'une étude par des approches complémentaires est nécessaire. L'utilisation de la fonction de tri cellulaire du cytomètre en flux pourrait être utilisée en couplage avec des méthodes d'analyse de diversité morphologique et génétique. Après concentration des particules par ultrafiltration et ultracentrifugation, on pourrait en effet tenter de séparer ces différents groupes à différentes périodes de l'année, puis, via l'observation des caractéristiques morphologiques par la MET (taille, forme), l'évaluation de la taille des génomes par PFGE, l'identification par utilisation d'amorces spécifiques et analyse en DGGE ou PCR quantitative, ou encore via la réalisation d'expériences d'infection virale, ainsi obtenir des caractéristiques précises concernant les virus composant ces quatre groupes viraux. Il serait ainsi sûrement possible d'attribuer un pourcentage probabiliste de l'appartenance de chacun de ces groupes plutôt aux bactériophages, cyanophages et virus eucaryotes. Cette étape nous semble être fondamentale dans la poursuite de la compréhension de la dynamique des virus aquatiques et de leurs interactions avec les communautés microbiennes.

Etude de diversité virale

Les travaux actuellement disponibles sur la question de la diversité des bactériophages en milieu aquatique concernent essentiellement les milieux marins. Comparativement, les milieux dulçaquicoles n'ont encore reçu que très peu d'attention (Filippini & Middelboe 2007). L'analyse de la diversité des virus est difficile en grande partie par le fait que la majorité des bactériophages ne peuvent être cultivés par les techniques classiques. Par ailleurs ceux-ci ne disposent pas d'éléments conservés, tels l'ADNr pour les procaryotes et les eucaryotes, qui permettraient d'évaluer leur diversité et leur évolution. Cependant une première approche par PFGE a largement été développée dans différentes études (Steward & Azam 1999, Suttle 2000, Larsen *et al.* 2001, Castberg *et al.* 2001, Ovreas *et al.* 2003, Riemann & Middelboe 2002, Breitbart *et al.* 2002, Venter *et al.* 2004). En complément des données acquises au cours de nos travaux, cette technique permettrait d'évaluer la taille des génomes viraux dans les trois lacs péri-alpins et donc d'effectuer une comparaison inter-lac

mais également une observation de l'évolution spatio-temporelle de ces tailles de génomes. Des travaux récents, utilisant cette technique, ont pu démontrer la variation spatio-temporelle de la composition de la communauté virale (Wommack *et al.* 1999, Castberg *et al.* 2001, Larsen *et al.* 2001, Larsen *et al.* 2004, Sandaa & Larsen 2006). A l'inverse dans d'autres écosystèmes, Riemann & Middelboe (2002) ainsi que Auguet *et al.* (2006) ont mis en évidence une très faible variation de la diversité virale sur de très longues échelles spatio-temporelles malgré de fortes variations d'abondances et d'activités microbiennes. Dans les écosystèmes d'eau douce, seulement deux études ont analysé la diversité virale par PFGE (Auguet *et al.* 2006, Filipini & Middelboe 2007). De la même manière que Filipini & Middelboe 2007, il serait très intéressant de comparer nos trois écosystèmes. En effet ces derniers ont comparé la diversité virale par PFGE de deux lacs méso- et eutrophes (Lac Frederiksborg et Esrum, Danemark) mais également d'un estuaire (Oserund, mer du Nord) et de la mer Baltique, aussi bien pour la colonne d'eau que dans les sédiments. Leurs résultats ont clairement démontré de fortes différences en terme d'empreintes génétiques virales entre les différents sites étudiés et la présence de certaines tailles de génomes uniquement dans des biotopes spécifiques (comme dans les lacs) ou dans des micro-habitats spécifiques (comme des strates sédimentaires particulières).

Pour aller au delà de la simple mesure de la taille des génomes par PFGE, qui ne donne donc qu'une image partielle de ce que peut être la diversité, et depuis les récents travaux de Angly *et al.* (2006) et Edwards & Rohwer (2005) qui ont initié cette approche en milieu marin, il semble essentiel aujourd'hui de construire une librairie métagénomique de la communauté virale lacustre. Elle pourrait être dans les années à venir la solution pour estimer efficacement la diversité génétique des particules virales. A plus long terme, la connaissance de cette diversité virale, associée à la diversité eucaryotique et procaryotique, pourra ainsi permettre d'appréhender beaucoup plus finement les relations spécifiques (ou non) existantes entre les virus et leur (s) cellules hôtes.

Variations spatiales intra-lac

Il est important de rappeler que notre approche expérimentale ne s'est intéressée qu'à la fraction superficielle de la colonne d'eau (0-10 mètres) et que l'approche écosystémique n'a concerné que la strate 0-50 mètres de la colonne d'eau. Un volume très important de la colonne d'eau, sachant qu'elle peut mesurer jusqu'à 310 mètres dans le lac Léman et 147 mètres dans le lac du Bourget, n'a pas été considéré. Compte tenu du caractère très différent

du comportement des communautés microbiennes entre la surface et les zones plus profondes (Hofle & Weinbauer 1998, Colombet *et al.* 2006), sans parler des sédiments (Danovaro *et al.* 2001, Bettarel *et al.* 2006), il semble important d'envisager dans la continuité de nos travaux de s'intéresser à ces couches d'eau au-delà des 50 m. Les questions traitées devront alors tenir compte de la part de production des communautés microbiennes à ces profondeurs et la part des communautés microbiennes transportées par la sédimentation et les mouvements de masse d'eau depuis la surface. L'importance de la lyse virale vs. la prédation protiste pourrait s'avérer très différente suivant que l'on s'intéresse à la surface ou aux eaux plus profondes. Pareillement, le pourcentage de bactéries lysogènes, le « decay », le temps de génération, la production et la diversité virale pourraient sûrement être très différents suivant les strates de la colonne d'eau considérée et l'importance comme l'influence des unes sur les autres mériterait d'être étudiée.

Prise en compte du métabolisme des cellules hôtes

L'approche écosystémique nous a permis de mettre en évidence la forte reproductibilité inter-annuelle et la variabilité saisonnière de la dynamique des communautés microbiennes dans les trois lacs péri-alpins, ainsi que le rôle de certains facteurs de type « bottom up » dans l'explication de la variabilité des communautés microbiennes, tandis que les facteurs « top down » sont apparus globalement moins structurants. Ce type de résultats a souvent été rapporté dans la littérature. Récemment, Burns & Galbraith (2007) ont rapporté pour 45 écosystèmes d'eau douce de fortes corrélations entre les nutriments et les groupes majeurs de la communauté microbienne et comparativement des relations faibles entre les organismes, suggérant que les nutriments ont en effet un rôle très important sur la composition et la biomasse des microorganismes, plus que les prédateurs. Toutefois, de forts impacts de lyse et de prédation ont pu être mesurés via l'approche expérimentale de dilution sur les procaryotes en été et au début de l'automne. La divergence des résultats sur l'importance du control « top down », par les deux types d'approches, nous a permis de conclure que les prédateurs et les virus peuvent ponctuellement influencer de manière significative la mortalité des bactéries hétérotrophes et des picocyanobactéries, mais, qu'ils ne semblent pas être des facteurs constants (durant toute l'année) dans la variabilité de l'abondance des communautés microbiennes. Le métabolisme des cellules hôtes semble être un des facteurs d'explication parmi les plus pertinents pour comprendre l'absence de lyse virale à certaines saisons, en particulier en hiver et au début du printemps.

Compte tenu de la grande diversité taxonomique et fonctionnelle qui peut exister au sein de l'assemblage des cellules hôtes (bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries), il apparaît indispensable à l'avenir d'inclure dans nos approches des mesures d'activités métaboliques des cellules hôtes. De nombreux types de mesures peuvent s'avérer très informatifs : des mesures classiques de productions primaire (des eucaryotes et des cyanobactéries) et bactérienne, mais aussi l'utilisation de marqueurs d'activités, d'intégrité membranaires, de viabilité utilisables en CMF en utilisant des colorants comme le DiBAC, BACTLIGHT LIVE/DEAD, SYTOX Green, CFDA, etc. Une technique qui semble également applicable à nos communautés et qui permettrait de contrôler le degré d'activités des cellules identifiées dans de grande famille est le micro-card-fish basé sur le couplage de la micro-autoradiographie et du Card-FISH (Herndl *et al.* 2007).

Mieux comprendre les cycles de vie des virus

En analysant au cours du temps, l'évolution différentielle des virus et des bactéries (par le VBR), les résultats suggérés par l'approche écosystémique, ainsi que la variabilité de l'activité lytique des virus, de nombreuses questions sont apparues sur les virus et leur utilisation des différents cycles viraux. Une hypothèse envisagée serait une utilisation différentielle des stratégies (cycles) virales en fonction du métabolisme de la cellule hôte et donc des conditions physico-chimiques. Il serait très intéressant de mesurer la lysogénie virale dans les trois lacs péri-alpins dans les prochaines années afin d'expliquer potentiellement la stratégie de vie des virus, typiquement dans le lac oligotrophe (lac d'Annecy) et durant les périodes hivernales. Le pourcentage de bactéries lysogènes est un paramètre qu'il est facile d'étudier via l'utilisation d'agents mutagènes tels que la mictomycin C. Pour être complet, il serait pertinent de mesurer régulièrement, à différentes profondeurs et pour les 3 lacs d'intérêt le « decay », le turnover viral, la production virale, etc. L'ensemble de ces paramètres permettrait en effet d'approcher d'une manière différente de la notre le rôle fonctionnel potentiel des virus au sein de ces écosystèmes.

Lors de notre étude, nous avons suspecté l'existence d'un cycle chronique, comme cela avait été fait pour un autre lac alpin (Lac Gossenköllesee, Autriche) par Hofer & Sommaruga (2001). Il est clair que nous n'avons apporté aucune preuve directe de l'existence d'un tel cycle et la mise en évidence de ce dernier devrait faire l'objet d'un profond travail méthodologique afin de pouvoir quantifier la libération de virus sans destruction des cellules hôtes.

Lier boucle microbienne et dynamique du métazooplancton

La dynamique des communautés microbiennes ne peut se concevoir qu'en considérant l'ensemble des relations entre microorganismes. Aujourd'hui, les relations de type proie-prédateur entre les composantes de la boucle microbienne et le métazooplancton (que l'on sait être potentiellement importantes) ne sont pas prises en compte. Une perspective de recherche intéressante serait donc d'étudier finement les relations existant entre la structure et le fonctionnement de la boucle microbienne et du métazooplancton pélagique des lacs péri-alpins. Fondamentalement, ce type de projets aurait pour objectif d'établir quels sont les liens entre réseaux trophiques microbiens (RTM) et réseaux trophiques herbivores (RTH), comment ces interactions varient dans le temps, comment la structure du métazooplancton affecte la dynamique, l'activité et la diversité des communautés microbiennes et quelles sont les interactions et cascades trophiques qui en découlent. Ce lien entre RTM et RTH n'a été que peu exploré par la communauté internationale et pas du tout au sein de nos lacs.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES CITEES

(Execptées celle des articles)

- Abedon S. T., Herschler T. D. & Stopar D. (2001) Bacteriophage latent period evolution as a response to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4233-4241.
- Abedon S. T., Hyman P. & Thomas C. (2003) Experimental examination of bacteriophage latent period evolution as a response to bacterial availability. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 7499-7506.
- Ackermann H. W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, **152**, 227-243.
- Ackermann H. W. (2001) Frequency of morphological phage descriptions. *Archives of Virology*, **146**, 843-857.
- Ackermann H. W. (1999) Tailed bacteriophages: The order Caudovirales. *Advances in virus research*, **51**, 135-201.
- Ackermann H. W. & Abedon S. T. (2000) Bacteriophage Names.
- Ackermann H. W. & Dubow M. S. (1987) Viruses of prokaryotes. In *General Properties of Bacteriophages*, vol. I. Boca Raton: CRC.
- Agis M., Granda A. & Dolan D. R. (2007) A cautionary note: Examples of possible microbial community dynamics in dilution grazing experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **341**, 176-183.
- Akin N. (2006) Effets des éléments nutritifs sur les communautés bactériennes planctoniques du lac d'Annecy. Rapport de Master Ecologie microbienne. In *INRA, Thonon-les-Bains Station d'Hydrobiologie Lacustre*, pp. 24. Lyon: Université Claude Bernard; Ecole Vétérinaire de Lyon; INSA de Lyon.
- Almeida M. A., Cunha M. A. & Alcantara F. (2001) Loss of estuarine bacteria by viral infection and predation in microcosm conditions. *Microbial Ecology*, **42**, 562-571.
- Alonso M., Jimenez-Gomez F., Rodriguez J. & Borrego J. (2001) Distribution of virus like particles in an oligotrophic marine environment (Alboran sea, Western Mediterranean). *Microbial Ecology*, **42**, 407-415.
- Andersen T., Schartau A. K. L. & Paasche E. (1991) Quantifying external and internal nitrogen and phosphorous pools, as well as nitrogen and phosphorous supplied through remineralization, in coastal marine plankton by means of a dilution technique. *Marine Ecology Progress Series*, **69**, 67-80.
- Anesio A. M., Hollas C., Graneli W. & Laybourn-Pary J. (2004) Influence of humic substances on bacterial and viral dynamics in freshwaters. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4848-4854.
- Angly F. E., Felts B., Breitbart M., Salamon P., Edwards R. A., Carlson C., Chan A. M., Haynes M., Kelley S., Liu H., Mahaffy J. M., Mueller J. E., Nulton J., Olson R., Parsons R., Rayhawk S., Suttle C. A. & Rohwer F. (2006) The marine viromes of four oceanic regions. *Plos Biology*, **4**, e368.

- Anneville O. (2001) Diagnostic sur l'évolution de l'état écologique du Léman par l'analyse des séries chronologiques du phytoplancton. In *Lyon*, pp. 268. Lyon: Université de Claude-Bernard-Lyon I.
- Auguet J. C., Montanié H. & Lebaron P. (2006) Structure of virioplankton in the Charente estuary (France): transmission electron microscopy versus pulsed field gel electrophoresis. *Microbial Ecology*, **51**, 197-208.
- Azam F., Fenchel T., Field J. G., Gray J. S., Meyer Reil M. A. & Thingstad F. (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257-263.
- Badwen F. C., Pirie N. W., Bernal J. D. & Fankuchen I. (1936) Liquid crystalline substances from virus infected plants. *Nature*, 1051-1052.
- Baines S. B. & Pace M. L. (1991) The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria-patterns across marine and freshwater systems. *Limnology and Oceanography*, **36**.
- Baroin G. (2001) Evolution naturelle Evolution anthropique. In *L'eau dans l'espace rural: vie et milieux aquatiques*, vol. 284 (ed. A. Neveu, C. Riou, R. Bonhomme, P. Chassin & F. Papy), pp. 97-112. Universités francophones Paris: INRA Editions.
- Barre-Sinoussi F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. & Montagnier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
- Barthelmes D. (1981) *Hydrobiologische Grundlagen der Binnenfischerei*: Gustav Fisher Verlag (ed.), Jéna.
- Baudoux A. C., Noordeloos A. A. M., Veldhuis M. J. W. & Brussaard C. P. D. (2006) Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during two spring blooms in spring temperate coastal waters. *Aquatic Microbial Ecology*, **44**, 207-217.
- Beijerinck A. M. (1899) Bemerkung zu dem Aufsatz von Hern Iwanowsky Uber die mosaikkrankheit der tabakspflanze. *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, **5**, 310-311.
- Beijerinck A. M. (1898) Over een contagium vivum fluidum als oorjaak van de vlekziekte der tabaksbladen. *Versl. gewone Vergad. wis en natuurr.Afd. K. Akad. Wet. Amst.*, **7**, 229-235.
- Bell R. T., Ahlgren G. A. & Ahlgren I. (1983) Estimating bacterioplankton production by measuring [³H]thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**, 1709-1721.
- Bergh O., Borsheim K. Y., Bratbak G. & Heldal M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-468.
- Bergström A.-K. & Jansson M. (2000) Bacterioplankton production in humic lake Ortrasket in relation to input of bacterial cells and input of allochthonous organic carbon. *Microbial Ecology*, **39**, 101-115.
- Bettarel Y. (2002) Importance quantitative et fonctionnelle des virus dans les écosystèmes aquatiques. Clermont Ferrand: U. Blaise Pascal.
- Bettarel Y., Amblard C., Sime-Ngando T., Carrias J. F., Sargos D., Garabetian F. & Lavandier P. (2003) Viral lysis, flagellate grazing potential and bacterial production in Lake Pavin : a short-term study. *Microbial Ecology*, **45**, 119-127.

- Bettarel Y., Bouvy M., Dumont C. & Sime-Ngando T. (2006) Virus-Bacteria Interactions in Water and Sediment of West African Inland Aquatic Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 5274-5282.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C., Bouvy M. & Arfi R. (2005) Low consumption of virus-sized particles by heterotrophic Nanoflagellates in two lakes of the French Massif Central. *Aquatic Microbial Ecology*, **39**, 205-209.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C. & Dolan J. (2004) Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 2941-2951.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C. & Laveran H. (2000) A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2283-2289.
- Binder B. (1999) Reconsidering the relationship between virally induced bacterial mortality and frequency of infected cells. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 207-215.
- Boenigk J., Matz C., Jurgens K. & Arndt H. (2002) Food concentration-dependent regulation of food selectivity of interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 195-202.
- Bongiorni L., Magagnini M., Armeni M., Noble R. T. & Danovaro R. (2005) Viral production, decay rates, and life strategies along a trophic gradient in the North Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6644-6650.
- Borsheim K. Y., Bratbak G. & Heldal M. (1990) Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 352-356.
- Bouvier T. & Del Giorgio P. A. (2007) A comparative study of the cytometric characteristics of high and low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, **9**, 2050-2066.
- Bouvier T. & del Giorgio P. A. (2007) Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environmental Microbiology*, **9**, 287-297.
- Bouvier T. C. & Del Giorgio P. A. (2002) Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, **47**, 453-470.
- Bratbak G., Haslund O. H., Head I. M., Naess A. & Roeggen T. (1992) Giant marine viruses. *Marine Ecology Progress Series*, **85**, 201-201.
- Bratbak G. & Heldal M. (1993) Total count of viruses in aquatic environments. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (ed. P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr & J. J. Cole), pp. 135-138. Boca Raton Fla.: Lewis.
- Bratbak G., Heldal M., Norland S. & Thingstad T. F. (1990) Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1400-1405.
- Bratbak G., Heldal M., Thingstad T. F., Riemann L. & Haslund O. H. (1992) Incorporation of viruses into the budget of microbial C-transfer. A first approach. *Marine Ecology Progress Series*, **83**, 273-280.
- Bratbak G., Thingstad T. F. & Heldal M. (1994) Viruses and the Microbial Loop. *Microbial Ecology*, **28**, 209-221.

- Breitbart M., Salamon P., Andresen B., Mahaffy J. M., Segall A. M., Mead D., Azam F. & Rohwer F. (2002) Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceeding of National Academy of Science USA*, **99**, 14250-14255.
- Briand J. F., Jacquet S., Flinois C., Avois-Jacquet C., Maissonnette C., Leberre B. & Humbert J.-F. (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*, **50**, 418-428.
- Brum J. R., Steward G. F., Jiang S. C. & Jellison R. (2005) Spatial and temporal variability of prokaryotes, viruses, and viral infections of prokaryotes in an alkaline, hypersaline lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **41**, 247-260.
- Brussaard C. P. D. (2004) Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1506-1513.
- Brussaard C. P. D., Marie D. & Bratbak G. (2000) Flow cytometric detection of viruses. *Journal of Virological Methods*, **85**, 175-182.
- Burkill P. H., Mantoura R. F. C., Llewellyn C. A. & Owens N. J. P. (1987) Microzooplankton grazing and selectivity of phytoplankton in coastal waters. *Marine Biology*, **93**, 581-590.
- Burns C. W. & Galbraith L. M. (2007) Relating planktonic microbial food web structure in lentic freshwater ecosystems to water quality and land use. *Journal of Plankton Research*, **29**, 127-139.
- Button D. K., Robertson B. R. & Juttner F. (1996) Microflora of a subalpine lake: bacterial populations, size and DNA distributions, and their dependence on phosphate. *FEMS Microbial Ecology*, **21**, 87-101.
- Calbet A. & Landry M. R. (2004) Phytoplankton growth, microzooplankton grazing, and carbon cycling in marine systems. *Limnology and Oceanography*, **49**, 51-57.
- Callieri C. & Stockner J. G. (2002) Fresh water autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnologie*, **61**, 1-14.
- Carlsson P. & Caron D. A. (2001) Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. *Limnology and Oceanography*, **46**, 108-120.
- Caron D. A. (1983) Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 249-268.
- Carrias J. F., Amblard C. & Bourdier G. (1996) Protistan bacterivory in an oligomesotrophic lake: importance of attached ciliates and flagellates. *Microbial Ecology*, **31**, 249-268.
- Castberg T., Larsen A., Sandaa R. A., Brussaard C. P. D., Egge J. K., Heldal M., Thyrrhaug R., van Hannen E. J. & Bratbak G. (2001) Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Marine Ecology Progress Series*, **221**, 39-46.
- Castberg T., Thyrrhaug R., Larsen A., Sandaa R. A., Heldal M., Van Etten J. L. & Bratbak G. (2002) Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Journal of Phycology*, **38**, 767-774.
- Chastel C. (1992) *Histoire des virus de la variole au sida*. Paris: Boubée (Ed.).

- Chen F., Lu J. R., Binder B. J., Liu Y. C. & Hodson R. E. (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 539-545.
- Chiura H. X. (1997) Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 75-83.
- CIPEL (ed.) (1997) *Résumé et conclusions générales*. Rapport de la Commission Internationale de la Protection des eaux du Léman contre la pollution- Campagne 1996. Lausanne (Switzerland).
- CISALB. (2006) Etude lourde du lac du Bourget 2004-2005, pp. 193. Thonon les bains: UMR CARTEL, INRA, Université de Savoie.
- Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M. A., Santos-Ferreira M. O., Laurent A. G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C. & al. e. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, **233**, 343-346.
- Claverie J. M. (2006) Virus takes center stage in cellular evolution. *Genome Biology*, **7**, 1-10.
- Clokic M. R. J., Millard A. D., Wilson W. H. & Mann N. H. (2003) Encapsidation of host DNA by bacteriophages infecting marine *Synechococcus* strains. *FEMS Microbial Ecology*.
- Cochlan W. P., Wilkner J., Steward G. F., Smith D. C. & Azam F. (1993) Spatial distribution of viruses, bacteria, chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Marine Ecology Progress Series*, **92**, 77-87.
- Cochran P. K., Kellogg C. A. & Paul J. H. (1998) Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, **164**.
- Cole J. J., Likens G. E. & Strayer D. L. (1982) Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology and Oceanography*, **27**, 1080-1090.
- Colombet J., Sime-Ngando T., Cauchie H. M., Fonty G., Hoffmann L. & Demeure G. (2006) Depth-related gradients of viral activity in Lake Pavin. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4440-4445.
- Comte J., Jacquet S., Viboud S., Fontvieille D., Paolini G. & Domaizon I. (2006) Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, February to July 2002). *Microbial Ecology*, **52**, 72-89.
- Cottrell M. T. & Kirchman D. (2000) Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophage-Flavobacteria* cluster consuming low- and high- molecular dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1692-1697.
- Cristofini B., Roybin D. & Etaix F. (1994) Qualifying regional development. A study in 28 cantons of the french Alps. In *Systems studies in agricultural and rural development* (ed. J. Brossier, L. de Bonneval & E. Landais), pp. 415.
- Danovaro R., Dell'Anno A., Trucco A., Serresi M. & Vanucci S. (2001) Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1384-1387.
- Davis C. C. (1955) *The marine and freshwater plankton*: Michigan State University press.
- Del Giorgio P. A., Gasol J., Vaqué D., Mura P., Agusti S. & Duarte C. M. (1996) Bacterioplankton community structure: protists control net production and the

- proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography*, **41**, 1169-1179.
- Dolan D. R., Gallegos C. L. & Moigis A. (2000) Dilution effects on microzooplankton in dilution grazing experiments. *Marine Ecology Progress Series*, **200**, 127-139.
- Domaizon I., Viboud S. & Fontvieille D. (2003) Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbial Ecology*, **46**, 317-329.
- Donner G., Schwartz K., Hoppe H. G. & Muyzer G. (1996) Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Archives of Hydrobiology Special issue Advanced Limnology*, **48**, 7-14.
- Dorigo U. (2005) Diversité comparée des communautés bactériennes et virales dans les grands lacs Alpains et étude des facteurs et processus impliqués dans la structuration de ces communautés. In *Savoie*, pp. 346. Chambéry: Haute Savoie.
- Dorioz J. M. & Blanc P. (2001) Maîtrise de la charge externe en phosphore des plans d'eau et fonctionnement des bassins versants. In *L'eau dans l'espace rural: vie et milieux aquatiques*, vol. 284 (ed. A. Neveu, C. Riou, R. Bonhomme, P. Chassin & F. Papy), pp. 113-132. Universités francophones Paris: INRA Editions.
- Dufour P. (1986) Phytoplankton et production primaire. In *Méthodologie d'étude des lagunes côtières*, vol. 36 (ed. R. UNESCO), pp. 16.
- Duhamel S. & Jacquet S. (2006) Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **64**, 316-322.
- Dussart B. (1963) Les grands lacs d'Europe Occidentale. *Année Biologiques*, **11-12**, 499-572.
- Dussart B. (1992) *Limnologie, l'étude des eaux continentales*. Paris: Boubée (Ed.), 2ème éd.
- Edwards R. A. & Rohwer F. (2005) Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 504-510.
- Eisenstark A. (1967) Bacteriophage techniques. In *Methods in virology*, vol. 1 (ed. K. Maramorosch & H. Kropowski), pp. 449-525. New York: Academic Press.
- Evans C., Archer S. D., Jacquet S. & Wilson W. H. (2003) Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquatic Microbial Ecology*, **30**, 207-219.
- Ewert D. & Paynter M. (1980) Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated sludge treatment process. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 67-69.
- Ferris M. M., Stoffel C. L., Maurer T. T. & Rowlen K. L. (2002) Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Analytical Biochemistry*, **304**, 249-256.
- Field A. M. (1982) Diagnostic virology using electron microscopy. *Advances in Viral research*, **27**, 1-69.
- Filippini M. & Middelboe M. (2007) Viral abundance and genome size distribution in the sediment and water column of marine and freshwater ecosystems. *FEMS Microbial Ecology*, **60**, 397-410.

- Fischer U. R. & Velimirov B. (2002) High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 1-12.
- Fischer U. R., Wieltschnig C., Kirchner A. K. T. & Velimirov B. (2006) Contribution of virus-induced lysis and protozoan grazing to benthic bacterial mortality estimated simultaneously in microcosms. *Environmental Microbiology*, **8**, 1394-1407.
- Forterre P. (2006) The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Research*, **117**, 5-16.
- Forterre P. (2006) Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: a hypothesis for the origin of cellular domain. *Proceeding of National Academy of Science USA*, **103**, 3669-3374.
- Forterre P. (2005) The two ages of the RNA world, and the transition to the DNA world, a story of viruses and cells. *Biochimie*, **87**, 793-803.
- Foucart T. (2006) Colinéarité et régression linéaire. *Mathématiques et Sciences humaines*, **173**, 5-25.
- Fraenkel-Conrat H. (1974) Descriptive catalogue of viruses. In *Comprehensive Virology*, vol. 1 (ed. H. Fraenkel-Conrat & R. R. Wagner), pp. 121-156. New York: Plenum Press.
- Fuhrman J. A. (1992) Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web. In Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. *Falkowski PG, Woohhead AD (eds) Plenum Press New York*, 361-383.
- Fuhrman J. A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541-548.
- Fuhrman J. A. & Azam F. (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology*, **66**, 109-120.
- Fuhrman J. A. & Noble R. T. (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, **42**, 1236-1242.
- Fuhrman J. A. & Suttle C. A. (1993) Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, **6**, 51-63.
- Gallegos C. L. (1989) Microzooplankton grazing on phytoplankton in the Rhode river, Maryland : non linear feeding kinetics. *Marine Ecology Progress Series*, **57**, 23-33.
- Gallo R. C., Sarin P. S., Gelmann E. P., Robert-Guroff M., Richardson E., Kalyanaraman V. S., Mann D., Sidhu G. D., Stahl R. E., Zolla-Pazner S., Leibowitch J. & Popovic M. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865-867.
- Garza D. R. & Suttle C. A. (1995) Large double-stranded DNA viruses which cause the lysis of marine heterotrophic nanoflagellates (*Bodo sp.*) occur in natural marine virus communities. *Aquatic Microbial Ecology*, **9**, 203-210.
- Gasol J., Comerma M., Carlos-Garcia J., Armengol J., Casamayor E. O., Kojecka P. & Simek K. (2002) A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production and community composition in a eutrophic canyon shaped reservoir. *Limnology and Oceanography*, **47**, 62-77.
- Gasol J. M. & Duarte C. M. (2000) Comparative Analyses in Aquatic Microbial Ecology: How far do they go ? *FEMS Microbial Ecology*, **31**, 99-106.

- Gasol J. M., Zweifel U. L., Peters F., Fuhrmann J. A. & Hagström Å. (1999) Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4475-4483.
- Gifford D. J. (1988) Impact of grazing by microzooplankton in the northwest Arm of Halifax Harbour, Nova Scotia. *Marine Ecology Progress Series*, **47**, 249-258.
- Gillet C. & Quetin P. (2006) Effect of temperature changes on the reproductive cycle of roach in Lake Geneva from 1983 to 2001. *Journal of Fish Biology*, **69**, 518-541.
- Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L. & Field K. G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, **345**, 60-63.
- Gobler C. J., Hutchins D. A., Fisher N. S., Cosper E. M. & Sanudo-Wilhelm S. (1997) Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnology and Oceanography*, **42**.
- Goddard V., Baker A. C., Davy J. E., Adams D. G., M.M. D. V., Thackeray S. J., Maberly S. C. & Wilson W. H. (2005) Temporal distribution of viruses, bacteria and phytoplankton throughout the water column in a freshwater hypereutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **39**, 211-223.
- Gonzales N., Sherr E. B. & Sherr B. F. (1990) Size selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 583-589.
- Gonzales N. & Suttle C. A. (1993) Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles: ingestion and digestion. *Marine Ecology Progress Series*, **94**, 1-10.
- Gonzales N., Suttle C. A., Sherr E. B. & Sherr B. F. (1992) Grazing on viruses by marine phagotrophic protists. In *ASLO Meeting Abstract*. Santa Fee, USA.
- Goyal S. (1987) Methods in phage ecology. In *Phage ecology* (ed. S. M. Goyal, C. P. Gerba & G. Bitton), pp. 227-287. New York: Wiley-Interscience.
- Grover J. P. & Chrzanowski T. H. (2000) Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquatic Microbial Ecology*, **23**, 41-54.
- Guillou L., Moon-Van Der Staay S. Y., Claustre H., Partensky F. & Vaultot D. (1999) Diversity and abundance of *Bolidophyceae* (*Heterokonta*) in two oceanic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4528-4536.
- Guixa-Boixereu N., Calderon-Paz J. I., Heldal M., Bratbak G. & Pedros-Alio C. (1996) Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquatic Microbial Ecology*, **11**, 215-227.
- Guixa-Boixereu N., Lysnes K. & Pedros-Alio C. (1999) Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1949-1958.
- Guixa-Boixereu N., Vaqué D., Gasol J., Sanchez-Camara J. & Pedros-Alio C. (2001) Viral distribution and activity in Antarctic waters. *Deep-Sea Research*, **49**, 827-845.
- Hambly E. & Suttle C. A. (2005) The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 444-450.

- Hara S., Terauchi K. & Koike I. (1991) Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2731-2734.
- Heldal M. & Bratbak G. (1991) Production and decay of viruses in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series*, **72**, 205-212.
- Hennes K. P. & Suttle C. A. (1995) Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1050-1055.
- Herndl G., Sintes E., Reinthaler T., Varela M., Agogue H. & Van Aken H. M. (2007) Bacterial and archaeal diversity and function in the major deep water masses of the North Atlantic. *Geophysical Research*, **9**, 043 059.
- Hessen D. O. (1992) Dissolved organic carbon in a humic lake: effects on bacterial production and respiration. *Hydrobiologia*, **229**, 115-123.
- Hewson I. & Fuhrman J. A. (2006) Viral impacts upon marine bacterioplankton assemblage structure. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **86**, 577-589.
- Hewson I., O'Neil J. M., Fuhrman J. A. & Dennison W. C. (2001) Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries. *Limnology and Oceanography*, **46**, 1734-1746.
- Hirayama S., Ueda R., Sugata K. & Kamiyoshi H. (1993) Production of bacteriolytic enzyme by bacteriophage from seawater. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**, 2166-2167.
- Hofer J. S. & Sommaruga R. (2001) Seasonal dynamics in a alpine lake: importance of filamentous forms. *Aquatic Microbial Ecology*, **26**, 1-11.
- Hofle M. G. (1992) Bacterioplankton community structure and dynamics after large-scale release of non-indigenous bacteria as revealed by low-molecular-weight-RNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3164-3174.
- Hofle M. G., Haas H. & Dominik K. (1999) Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3164-3174.
- Hornak K., Masin M., Jezbera J., Bettarel Y., Nedoma J., Sime-Ngando T. & Simek K. (2005) Effects of decreased resource availability, protozoan grazing and viral impact on a structure of bacterioplankton assemblage in a canyon-shaped reservoir. *FEMS Microbial Ecology*, **52**, 315-327.
- Hulot F. D., Lacroix G., Lescher-Moutoué F. & Loreau M. (2000) Functional diversity governs ecosystem response to nutrient enrichment. *Nature*, **405**, 340-344.
- Humbert J.-F. & Le Berre B. (2001) Genetic diversity in two species of freshwater cyanobacteria, *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* and *P. agardhii*. *Archives of Hydrobiology*, **150**, 197-206.
- Hutchinson G. (1961) The paradox of the plankton. *American Naturaliste*, **95**, 137-145.
- Hutchinson G. (1967) *A treatise on limnology*. Introduction to lake biology and the limnoplankton, 2. New York: Willey, J & Sons (Ed).

- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. e. (1990) A guide to methods and applications. In *PCR protocols*. San Diego CA.
- Ivanovski D. I. (1894) Über die mosaikkrankheit der tabakspflanze. *Bulletin Academic Imperial Science Saint-Petesbourg*, **35**, 67-70.
- Jacob F. & Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, **3**, 318-356.
- Jacques J. & Treguer P. (1986) *Ecosystemes pélagiques marins*. Paris: Masson (Ed), collection écologie 19.
- Jacquet S., Briand J. F., Leboulanger C., Avois-Jacquet C., Oberhaus L., Tassin B., Vinçon-Leite B., Paolini G., Druart J. C., Anneville O. & Humbert J. F. (2005) The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful algae*, **4**, 651-672.
- Jacquet S., Domaizon I., Personnic S., Duhamel S., Heldal M., Pradeep Ram A. S. & Sime- Ngando T. (2005) Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshwater Biology*, **50**, 627-645.
- Jacquet S., Heldal M., Iglesias-Rodriguez D., Larsen A., Wilson W. & Bratbak G. (2002) Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 111-124.
- Jacquet S., Simek K., Weinbauer M. G., Sime-Ngando T., Bouvier T. & Bettarel Y. (2006) Relationships between viruses, bacteria and small grazers in aquatic ecosystems. Contributed talk to ISME-11, Vienna, Austria, August. (available at <http://jacquet.stephan.free.fr/diaporamas.htm>).
- Jardillier L., Bettarel Y., Richardot M., Bardot C., Amblard C., Sime-Ngando T. & Debroas D. (2005) Effects of Viruses and Predators on Prokaryotic Community Composition. *Microbial Ecology*, **50**, 557-569.
- Jiang S. C. & Paul J. H. (1994) Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Marine Ecology Progress Series*, **104**, 163-172.
- Jiang S. C. & Paul J. H. (1998) Significance of lysogeny in the marine environments: studies with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microbial Ecology*, **35**, 235-243.
- Jochem F. J. (2001) Morphology and DNA content of bacterioplankton in the northern Gulf of Mexico: analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 179-194.
- Jurgens K. (1994) Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs: a review. *Marine Microbial Food Webs*, **8**.
- Jurgens K., Pernthaler J., Schalla S. & Amann R. (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1241-1250.
- Jurgens K. & Simek K. (2000) Functional response and particle size selection of *Halteria cf. grandinella*, a common freshwater oligotrichous ciliate. *Aquatic Microbial Ecology*, **22**, 57-68.
- Kepner R., Wharton R. A. & Suttle C. A. (1998) Viruses in Antarctic Lakes. *Limnology and Oceanography*, **43**, 1754-1761.

- Kirchman D. L. (1993) Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (ed. K. P.F., B. F. Sherr, E. B. Sherr & J. J. Cole), pp. 509-512. Boca Raton: Lewis Pub.
- Kirschner A. K. T. & Velimirov B. (1999) Modification of the ^3H -leucine centrifugation method for determining bacterial protein synthesis in freshwater samples. *Aquatic Botany*, **17**, 201-206.
- Kisand V. & Zingel P. (2000) Dominance of ciliate grazing on bacteria during spring in a shallow eutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **22**, 135-142.
- Kuipers B. R. & White H. J. (2000) Prochlorophytes as secondary prey for heterotrophic nanoflagellates in the deep chlorophyll maximum layer of the (sub)tropical North atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, **204**, 53-63.
- Landry M. R., Brown S. L., Constantinou J. & Liu H. (1998) Spatial patterns in phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the Arabial Sea during monsoon forcing. *Deep sea research II*, **45**, 2353-2368.
- Landry M. R., Haas L. W. & Fagerness V. L. (1984) Dynamics of microbial plankton communities: experiments in Kaneohe Bay, Hawai. *Marine Ecology Progress Series*, **16**, 127-133.
- Landry M. R. & Hassett R. P. (1982) Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Marine Biology*, **67**, 283-288.
- Landry M. R., Kirshtein J. & Constantinou J. (1995) A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, **120**, 53-63.
- Landry M. R., Monger B. C. & Selph K. E. (1993) Time dependency of microzooplankton grazing and phytoplankton growth in the sub-Arctic Pacific. *Progress in oceanography*, **32**, 205-222.
- Langenheder S. & Jurgens K. (2001) Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography*, **46**, 121-134.
- Larsen A., Castberg T., Sandaa R. A., Brussaard C. P. D., Egge J., Heldal M., Paulino A., Thyrrhaug R., van Hannen E. J. & Bratbak G. (2001) Population dynamics and diversity of phytoplankton, bacteria and viruses in a seawater enclosure. *Marine Ecology Progress Series*, **221**, 47-57.
- Larsen A., Flaten G. A. F., Sandaa R. A., Castberg T., Thyrrhaug R., Erga S. R., Jacquet S. & Bratbak G. (2004) Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography*, **49**, 180-190.
- Lavandier P. (1990) Dynamics of bacterioplankton in a mesotrophic French reservoir (Pareloup). *Hydrobiologia*, **207**, 79-86.
- Lebaron P., Parthuisot N. & Catala P. (1998) Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1725-1730.
- Lebaron P., Servais P., Baudoux A. C., Bourrain M., Courties C. & Parthuisot N. (2002) Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **28**, 131-140.

- Lebaron P., Servais P., Troussellier M., Courties C., Vives-Rego, Muyzer G., Bernard L., Guindulain T., Schäfer H. & Stackebrandt E. (1999) Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, **19**, 255-267.
- Lemarchand K., Parthuisot N., Catala P. & Lebaron P. (2001) Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 301-309.
- Lessard E. J. & Murrell M. C. (1998) Microzooplankton herbivory and phytoplankton growth in the northwestern Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, **16**, 173-188.
- Li W. K. W. & Dickie P. M. (2001) Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal Inlet (Belford bassin) by flow cytometry. *Cytometry*, **44**, 236-246.
- Li W. K. W., Jellet J. F. & Dickie P. M. (1995) DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO or TOTO-PRO. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1485-1495.
- Lindström E. S. & Leskinen E. (2002) Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of the 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology*, **44**, 1-9.
- Lisle J. T., Hamilton W. A., Willse A. R. & McFeters G. A. (2004) Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5343-5348.
- Loeffler F. & Frosch P. (1897) Summarisher bericht uber die ergebnisse der untersuchungen der kommission zur erforschung der maul und klauenseuche bei dem institut fur infektionskrankheiten in berlin. *Centralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde und infektionskrankheiten*, **22**, 257-259.
- Longnecker K., Sherr E. B. & Sherr B. F. (2005) Activity and phylogentic diversity of high and low nucleic acid content, and ETS-active, bacterial cells in an upwelling ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7733-7749.
- Lwoff A. (1957) The concept of virus. *Journal of Genetic Virology*, **17**, 239-253.
- Makarek V. & Legendre P. (2002) Nonlinear redundancy analysis and canonical correspondence analysis based on polynomial regression. *Ecology*, **83**, 1146-1161.
- Mann N. H., Cook A., Millard A., Bailey S. & Clokie M. (2003) Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*, **424**, 741.
- Maranger R. & Bird D. F. (1995) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series*, **121**, 217-226.
- Maranger R., Bird D. F. & Juniper S. K. (1994) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and freshwaters. *Marine Ecology Progress Series*, **121**, 217-226.
- Maranger R., del Giorgio P. A. & Bird D. F. (2002) Accumulation of damaged bacteria and viruses in lake water exposed to solar radiation. *Aquatic Microbial Ecology*, **28**, 213-227.
- Marciano D. K., Russel M. & Simon S. M. (1999) An aqueous channel for filamentous phage export. *Science*, **284**, 1516-1519.

- Marie D., Brussaard C. P. D., Thyrhaug R., Bratbak G. & Vaulot D. (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 45-52.
- Marie D., Partensky F., Jacquet S. & Vaulot D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 186-193.
- Marie D., Partensky F., Simon N., Guillou L. & Vaulot D. (2000) Flow cytometry analysis of marine picoplankton. *Living Colors: Protocols in Flow Cytometry and Cell sorting*, **421-454**.
- Marie D., Partensky F., Vaulot D. & Brussaard C. P. D. (1999) Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. *Current Protocols In Cytometry*, 11.11.11-11.11.15.
- Marsily G. d. (1995) *L'eau, Collection Dominos Flammarion*.
- Massana R., Murray A. E., Preston C. M. & DeLong E. F. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 50-56.
- Mathias C. B., Kirchner A. K. T. & Velimirov B. (1995) Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube river. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3734-3740.
- Matz C., Boenigk J., Arndt H. & Jurgens K. (2002) Role of bacterial phenotypic traits in selective feeding of the heterotrophic nanoflagellate *Spunella* sp. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 137-148.
- Matz C. & Jurgens K. (2003) Interaction of nutrient limitation and protozoan grazing determines the phenotypic structure of a bacterial community. *Microbial Ecology*, **45**, 384-398.
- Métézeau P., Migliérina R. & Ratinaud M.-H. (1988) La cytometry en flux. *Guide pratique de la préparation à l'analyse des cellules*.
- Méthé B. A. & Zehr J. P. (1999) Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia*, **401**, 77-96.
- Meybeck M. (1970) *Bilan hydrochimique et géochimique du Lac Léman*. Thonon: Université de Paris.
- Middelboe M. (2000) Bacterial growth rate and marine virus host dynamics. *Microbial Ecology*, **40**, 114-124.
- Middelboe M. & Glud R. N. (2003) Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnology and Oceanography*, **48**, 1447-1456.
- Middelboe M., Hagstrom A., Blackburn N., Sinn B., Fischer U., Borch N. H., Pinhassi J., Simu K. & Lorenz M. G. (2001) Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microbial Ecology*, **42**, 395-406.
- Middelboe M. & Jorgensen N. O. G. (2006) Viral lysis of bacteria: an important source of dissolved amino acids and cell wall compounds. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **86**, 605-612.

- Middelboe M., Jorgensen N. O. G. & Kroer N. (1996) Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1991-1997.
- Middelboe M. & Lyck P. G. (2002) Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 187-194.
- Molinero J. C., Anneville O., Souissi S., Balvay G. & Gerdeaux D. (2006) Anthropogenic and climate forcing on the long-term changes of planktonic in Lake Geneva, Europe. *Journal of Plankton Research*, **28**, 287-296.
- Murray A. G. & Jackson G. A. (1992) Viral dynamics: a model of the effect of size, shape, motion and abundance of single celled planktonic organisms and other particles. *Marine Ecology Progress Series*, **89**, 103-116.
- Nagasaki K., Ando M., Itakura S., Imai I. & Ishida Y. (1994) Viral mortality in the final stage of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) red tide. *Journal of Plankton Research*, **16**.
- Noble R. T. (2001) Enumeration of viruses. In *Methods In Microbiology*, vol. 30, pp. 43-50.
- Noble R. T. & Fuhrman J. A. (2000) Rapid virus production and removal as measured with fluorescently labeled viruses as tracers. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3790-3797.
- Noble R. T. & Fuhrman J. A. (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 113-118.
- Noble R. T., Middelboe M. & Fuhrman J. A. (1999) Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 1-13.
- Ortmann A. C., Lawrence J. E. & Suttle C. A. (2002) Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the cyanobacterium *Synechococcus* spp. *Microbial Ecology*, **43**, 225-231.
- Ovreas L., Bourne D., Sandaa R. A., Casamayor E. O., Benlloch S., Goddard V., Smerdon G., Heldal M. & Thingstad T. F. (2003) Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, **31**, 109-121.
- Pace M. L. & Bailif. (1987) Evaluation of fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. *Marine Ecology Progress Series*, **40**, 185-193.
- Padan E. & Shilo M. (1973) Cyanophages-Viruses attacking blue green algae. *Bacteriological Reviews*, 343-370.
- Paranjape M. A. (1987) Grazing by microzooplankton in the eastern Canadian arctic in summer 1983. *Marine Ecology Progress Series*, **40**, 239-246.
- Paul J. (2000) Ecology of bacteriophages in nature. In *Viral Ecology* (ed. C. Hurst), pp. 211-246. San Diego: Academic Press.
- Paul J. & Jiang S. C. (2001) Lysogeny and transduction. In *Methods In Microbiology*, vol. 30 (ed. J. Paul), pp. 105-125. San Diego: Academic press.

- Paul M. L., Jiang S. C. & Brose J. B. (1991) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2197-2204.
- Pedros-Alio C., Calderon-Paz J. I. & Gasol J. M. (2000) Comparative analysis shows that bacterivory, not viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbial Ecology*, **32**, 157-165.
- Peduzzi P. & Weinbauer M. G. (1993) Effect of the submicron size fraction including viruses on the formation of algal flocs (marine snow) in the sea. *Limnology and Oceanography*, **38**, 1562-1565.
- Pernthaler J., Sattler B., Simek K., Schwarzenbacher A. & Psenner R. (1996) Top-down effects on the size biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community. *Aquatic Microbial Ecology*, **10**, 255-263.
- Pina S., Creus A., Gonzales N., Girones R., Felip M. & Sommaruga R. (1998) Abundance, morphology and distribution of planktonic virus like particles in two high mountain lakes. *Journal of Plankton Research*, **20**, 2413-2421.
- Pinhassi J., Azam F., Hemphala J., Long R. A., Martinez R., Zweifel U. L. & Hagstrom A. (1999) Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology*, **17**, 13-26.
- Pomeroy L. R. (1974) The oceans food web, a changing paradigm. *Bioscience*, **24**, 499-504.
- Pomeroy L. R., Sheldon J. E. & Peters F. (1995) Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, **117**, 259-268.
- Posch T., Simek K., Vrba J., Pernthaller J., Nedoma A., Sattler B., Sonntag B. & Psenner R. (1999) Predators induced changes of bacterial size-structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 235-246.
- Pourriot R. & Meybeck M. (1995) *Limnologie générale*. Collection d'Ecologie.
- Pradeep Ram A. S., Boucher D., Sime-Ngando T., Debroyas D. & Romagoux J. C. (2005) Phage bacteriolysis, protistan bacterivory, and bacterial production in a freshwater reservoir: coupling with temperature. *Microbial Ecology*, **50**, 64-72.
- Prangishvili D., Forterre P. & Garrett R. (2006) Viruses of the Archaea : a unifying view. *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 837-848.
- Proctor L. M. & Fuhrman J. A. (1990) Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, **343**, 60-62.
- Raoult D., Audic S., Robert C., C. A., Renesto P., Ogata H., La Scola B., Suzan M. & Claverie J. M. (2004) The 1.2-Megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, **306**, 1344-1350.
- Reckerman M. & Veldhuis M. J. W. (1997) Trophic interactions between picophytoplankton and macro-and nanozooplankton in the western Arabian Sea during the NE monsoon 1993. *Aquatic Microbial Ecology*, **12**, 263-273.
- Reed W. & Carroll J. (1902) The etiology of yellow fever. *Am. Med.*, **3**, 301-305.
- Reisser W., Grein S. & Krambeck C. (1993) Extracellular DNA in aquatic ecosystems may in part be due to phycovirus activity. *Hydrobiologia*, **252**, 199-201.
- Ridley M. (2000) The search for LUCA. *Natural History*, 82-85.

- Riemann B. & Sondergaard M. (1986) Carbon dynamics in eutrophic temperate lakes. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Riemann B., Steward G. F. & Azam F. (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 578-587.
- Riemann L. & Middelboe M. (2002) Temporal and spatial stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 219-232.
- Rivkin R., Putland J., Anderson M. & Deibel D. (1999) Microzooplankton bacterivory and herbivory in the NE subarctic Pacific. *Deep sea research II*, **46**, 2579-2618.
- Rodriguez F., Fernandez E., Head R. N., Harbour D. S., Bratbak G., Heldal M. & Harris R. P. (2000) Temporal variability of viruses, bacteria, phytoplankton and zooplankton in the western English Channel off Plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **80**, 575-586.
- Salcher M. M., Hofer J., Hornák K., Jezbera J., Sonntag B., Vrba J., Simek K. & Posch T. (2007) Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: Growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS Microbial Ecology*, **60**, 40-50.
- Samuelsson K. & Anderson A. (2003) Predation limitation in the pelagic microbial food web in an oligotrophic aquatic system. *Aquatic Microbial Ecology*, **30**, 239-250.
- Sandaa R. A. & Larsen A. (2006) Seasonal variations in viral-host populations in Norwegian coastal waters: Focusing on the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4610-4618.
- Sanders R. W., Caron D. A. & Berninger U. D. (1992) Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series*, **86**, 1-4.
- Sanders R. W., Porter K. G., Bennett S. J. & DeBiase A. E. (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers and cladocerans in a fresh-water planktonic community. *Limnology and Oceanography*, **34**, 673-687.
- Sawstrom C., Anesio M., Graneli W. & Laybourn-Parry J. (2007) Seasonal Viral Loop Dynamics in Two Large Ultraoligotrophic Antarctic Freshwater Lakes. *Microbial Ecology*, **53**, 1-11.
- Schäfer H., Bernard L., Courties C., Lebaron P., Servais P., Pukall R., Stackebrandt E., Troussellier M., Guindulain T., Vives-Rego J. & Muyzer G. (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microb. Ecol.*, **34**, 243-253.
- Schauer M., Massana R. & Pedrós-Alió C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbial Ecology*, **33**, 51-59.
- Schwalbach M. S., Hewson I. & Fuhrman J. A. (2004) Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms. *Aquatic Microbial Ecology*, **34**, 117-127.

- Servais P. (1995) Estimation de la biomasse et de l'activité des bactéries en milieux aquatiques. In *Oceanis Ecologie bactérienne des milieux aquatiques*.
- Servais P., Laurent P., Billen G. & Gatel D. (1995) Développement d'un modèle décrivant les variations de CODB et de biomasse bactérienne dans les réseaux de distribution. *Revue des sciences de l'eau*, **8**, 427-462.
- Seymour J. R., Seuront L., Doubell M., Waters R. L. & Mitchell J. G. (2006) Microscale patchiness of virioplankton. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **86**, 551-561.
- Sherr E. B. & Sherr B. F. (1993) Protistan grazing rates via uptake of fluorescent labelled prey. In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (ed. P. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr & J. Cole), pp. 695-701.
- Sherr E. B., Sherr B. F. & Longnecker K. (2006) Distribution of bacterial abundance and cell-specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean. *Deep Sea Research*, **53**, 713-725.
- Shopov A., Williams S. C. & Verity P. G. (2000) Improvements in image analysis and fluorescence microscopy to discriminate and enumerate bacteria and viruses in aquatic samples. *Aquatic Microbial Ecology*, **22**, 103-110.
- Simek K., Hornak K., Masin M., Christaki U., Nedoma J., Weinbauer M. G. & Dolan J. R. (2003) Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, **31**, 123-135.
- Simek K., Kojacka P., Nedoma J., Hartman P., Vrba J. & Dolan D. R. (1999) Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography*, **20**, 1634-1644.
- Simek K., Macek M., Seda J. & Vyhnaek V. (1990) Possible food chain relationship between bacterioplankton, protozoans and cladocerans in a reservoir. *International Revue Gesamten Hydrobiol.*, **75**, 583-596.
- Simek K., Pernthaller J., Weinbauer M. G., Hornak K., Dolan J. R., Nedoma J., Masin M. & Amann R. (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2723-2733.
- Simek K., Vrba J., Pernthaler J., Posch T., Hartman P., Nedoma J. & Psenner R. (1997) Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 578-595.
- Simek K., Weinbauer M. G., Hornak K., Jezbera J., Nedoma J. & Dolan J. (2007) Grazer and virus induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. *Environmental Microbiology*, **9**, 789-800.
- Sime-Ngando T. (1997) Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. *Année Biologiques*, **36**, 181-206.
- Sime-Ngando T., Bettarel Y., Chartogne C. & Sean K. (2003) The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Research Development Microbiology*, **7**, 481-497.

- Sime-Ngando T. & Hartmann H. J. (1990) Short term variations of the abundance and biomass of planktonic ciliates in a eutrophic lake. *European Journal of Protistology*, **27**, 249-263.
- Sime-Ngando T. & Pradeep Ram A. S. (2005) Grazer effects on prokaryotes and viruses in a freshwater microcosm experiment. *Aquatic Microbial Ecology*, **41**, 115-124.
- Sommaruga R., Krössbacher M., Salvenmoser W., Catalan J. & Psenner R. (1995) Presence of large virus-like particles in a eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, **9**, 305-308.
- Spencer R. (1955) A marine bacteriophage. *Nature*, **175**, 690.
- Spon J. (1680) Histoire de Genève, vol. 1, pp. 7-13. Lyon.
- Stanley W. M. (1935) Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus. *Science*, **81**, 644-645.
- Steward G. F. & Azam F. (1999) Analysis of marine viral assemblages. In *Microbial Biosystems: New frontiers proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology* (ed. C. R. Bell, M. Brylinsky & P. Johnson-Green), pp. 159-165. Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology.
- Steward G. F., Montiel J. L. & Azam F. (2000) Genome size distributions indicate variability and similarities among marine viral assemblages from diverse environments. *Limnology and Oceanography*, **45**, 1697-1706.
- Steward G. F., Smith D. C. & Azam F. (1996) Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi sea. *Marine Ecology Progress Series*, **131**.
- Steward G. F., Wikner J., Smith D. C., Cochlan W. P. & Azam F. (1992) Estimation of virus production in the sea: I. Method development. *Marine Microbial Food Webs*, **6**, 57-78.
- Strom S. L. & Welschmeyer N. A. (1991) Pigment-specific rates of phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the open subarctic Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, **36**, 50-63.
- Sundh I. & Bell R. T. (1992) Extracellular dissolved organic carbon released from phytoplankton as a source of carbon for heterotrophic bacteria in lakes of different humic content. *Hydrobiologia*, **229**, 93-106.
- Suttle C. A. (2000) Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. *Kluwer Academic publishers*, 563-589.
- Suttle C. A. (1992) Inhibition of photosynthesis by the submicron size fraction concentrated from seawater. *Marine Ecology Progress Series*, **87**, 105-112.
- Suttle C. A. (1994) The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*, **28**, 237-243.
- Suttle C. A. (2005) Viruses in the sea. *Nature*, **437**.
- Suttle C. A., Chan A. M. & Cottrell M. T. (1990) Infection of viruses by phytoplankton and reduction of primary productivity. *Nature*, **347**, 467-469.
- Suttle C. A. & Chen F. (1992) Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3721-3729.

- Suzuki K., Tsuda A., Kiyosawa H., Takeda S., Nishioka J., Saino T., Takahashi M. & Wong C. S. (2002) Grazing impact of microzooplankton on a diatom bloom in a mesocosm as estimated by pigment-specific dilution technique. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **27**, 99-120.
- Suzuki M. T. (1999) Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology*, **20**.
- Tadonl  k   D. R. (2007) Strong coupling between natural Planctomycetes and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. *FEMS Microbial Ecology*, **59**, 543 -555.
- Tapper M. A. & Hicks R. E. (1998) Temperate viruses and lysigeny in lake superior bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, **43**, 95-103.
- Tarutani K., Nagasaki K. & Yamaguchi M. (2000) Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4916-4920.
- Thingstad F. (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*, **45**, 1320-1328.
- Thingstad T. F., Havskum H., Zweifel U. L., Berdalet E., Sala M., Peters F., Alcaraz M., Scharek R., Perez M., Jacquet S., Fonnes G. A., Dolan J., Marrase C., Rassoulzadegan F., Hagström A. & Vaulot D. (2007) Ability of a "minimum" microbial food web model to reproduce response patterns observed in mesocosms manipulated with N and P, glucose, and Si. *Journal of Marine Systems*, **64**, 15-34.
- Thingstad T. F. & Lignell R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 19 - 27.
- Thouvenot A., Richardot M., Debroas D. & Devaux J. (1999) Bacterivory of metazooplankton, ciliates and flagellates in a newly flooded reservoir. *Journal of Plankton Research*, **21**, 1659-1679.
- Tomaru Y., Katanozaka N., Nishida K., Shirai Y., Tarutani K., Yamaguchi M. & Nagasaki K. (2004) Isolation and characterization of two distinct types of HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Microbial Ecology*, **34**, 207-218.
- Toolan T., Wehr J. D. & Findlay S. (1991) Inorganic phosphorus stimulation of bacterioplankton production in a meso-eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2074-2078.
- Torrela F. & Morita R. Y. (1979) Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophages particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 774-778.
- Tranvik L. (1988) Availability of dissolved organic carbon for planktonic bacteria in oligotrophic lakes of different humic content. *Microbial Ecology*, **16**, 311-322.
- Tranvik L. & Sieburth J. M. (1989) Effects of flocculated humic matter on free attached pelagic microorganisms. *Limnology and Oceanography*, **34**, 688-699.

- Troussellier M., Courties C. & Zettelmaier S. (1995) Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: fixation and storage effects. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **40**, 621-633.
- Troussellier M., Got P., Mboup M., Corbin D., Giuliano L., Cappello S. & Bouvy M. (2005) Daily bacterioplankton dynamics in a sub-Saharan estuary (Senegal River, West Africa): a mesocosm study. *Aquatic Microbial Ecology*, **40**, 13-24.
- Tulonen T., Salonen K. & Arvola L. (1992) Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. *Hydrobiologia*, **229**, 239-252.
- Turley C. M. & Hughes D. J. (1992) Effects of storage on direct estimates of bacterial numbers of preserved seawater samples. *Deep Sea Research*, **39**, 375-394.
- Twort F. W. (1915) An investigation of the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet*, **2**, 1241-1243.
- Van Hanne E. J., Zwart G., Van Agterveld M. P., Gons H., Ebert J. & Laanbroek H. J. (1999) Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 795-801.
- Vaulot D. (1989) CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise*, **2:8**.
- Venter C. J., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A., Wu D., Paulsen I., Nelson K. E., Nelson W., Fouts D. E., Levy S., Knap A. H., Lomas M. W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parson R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.-H. & Smith H. O. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, **304**, 66-74.
- Verni F. & Gualtieri P. (1997) Feeding Behaviour in Ciliated Protists. *Micron*, **28**, 487-504.
- Vives-Rego J. V., Lebaron P. & Caron G. N. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FeMS Microbiology Reviews*, **24**, 429-448.
- Vollenweider R. A. (1975) Input-output models with special reference to the phosphorus loading concept in limnology. *Schweiz.Z.Hydrology*, **37**, 455-472.
- Vollenweider R. A. (1968) Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication, pp. 182. Paris: Rapport technique, Organisation pour la coopération et le développement économique.
- Vrede K., Stensdotter U. & Lindström E. S. (2003) Viral and bacterioplankton dynamics in two lakes with different humic contents. *Microbial Ecology*, **46**, 406-415.
- Weinbauer M. G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FeMS Microbiology Reviews*, **28**, 127-181.
- Weinbauer M. G., Christaki U., Nedoma A. & Simek K. (2003) Comparing the effects of resource enrichment and grazing on viral production in a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, **31**, 137-144.
- Weinbauer M. G., Fuks D., Puskaric S. & Peduzzi P. (1995) Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the Northern Adriatic sea. *Microbial Ecology*, **30**, 25-41.

- Weinbauer M. G. & Herndl G. (2002) Viruses and heterotrophic microplankton. In *Encyclopedia of life support systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO. Oxford, UK: Eolss.
- Weinbauer M. G. & Hofle M. G. (1998) Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 431-438.
- Weinbauer M. G., Hornak K., Jezbera J., Nedoma J., Dolan J. & Simek K. (2007) Synergistic and antagonistic effects of viral lysis and protistan grazing on bacterial biomass, production and diversity. *Environmental Microbiology*, **9**, 777-788.
- Weinbauer M. G. & Peduzzi P. (1995) Effect of virus-rich high molecular weight concentrates of seawater on the dynamics of dissolved amino acids and carbohydrates. *Marine Ecology Progress Series*, **127**, 245-253.
- Weinbauer M. G. & Peduzzi P. (1994) Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes. *Marine Ecology Progress Series*, **108**, 11-20.
- Weinbauer M. G. & Peduzzi P. (1995) Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in the Northern Adriatic Sea. *Journal of Plankton Research*, **17**, 1851-1856.
- Weinbauer M. G. & Rassoulzadegan F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity. *Environmental Microbiology*, **6**.
- Weinbauer M. G. & Suttle C. A. (1999) Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquatic Microbial Ecology*, **18**, 217-225.
- Weinbauer M. G., Winter C. & Hofle M. G. (2002) Reconsidering transmission electron microscopy based estimates of viral infection of bacterioplankton using conversion factors derived from natural communities. *Aquatic Microbial Ecology*, **27**, 103-110.
- Weisse T. & Kenter U. (1991) Ecological characteristics of autotrophic picoplankton in a prealpine lake. *Internationale. Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 493-504.
- Wen K., Ortmann A. C. & Suttle C. A. (2004) Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**.
- Wetzel R. G. (2001) *Limnology: lake and river ecosystems*. San Diego: Academic press.
- White P. A., Kalff J., Rasmussen J. B. & Gasol J. (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microbial Ecology*, **21**, 99-118.
- Wieltschnig C., Fischer U. R., Kirchner A. K. T. & Velimirov B. (2003) Benthic bacterial production and protozoan predation in a silty freshwater environment. *Microbial Ecology*, **46**, 62-72.
- Wieltschnig C., Kirchner A. K. T., Steitz A. & Velimirov B. (2001) Weak coupling between heterotrophic nanoflagellates and bacteria in a eutrophic freshwater environment. *Microbial Ecology*, **42**, 159-167.
- Wildi W. & Pugin A. (1998) Histoire géologique du relief du bassin lémanique. *Archs. Sci. Genève*, **51**, 5-12.
- Wilhelm S. W., Brigden S. M. & Suttle C. A. (2002) A dilution technique for the direct measurement of viral production: A comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microbial Ecology*, **43**, 168-173.

- Wilhelm S. W. & Suttle C. A. (1999) Viruses and Nutrient Cycles in the Sea - Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, **49**, 781-788.
- Wilhelm S. W. & Suttle C. A. (2000) Viruses as regulators of nutrient cycles in aquatic environments. In *Microbial Biosystems* (ed. C. R. Bell, M. Brylinsky & P. Johnson-Green), pp. 551-556. Atlantic Canada society for Microbial Ecology, Halifax.
- Williamson S. J., Houchin L. A., McDaniel L. & Paul J. H. (2002) Seasonal Variation in Lysogeny as Depicted by Prophage Induction in Tampa Bay, Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4307-4314.
- Wilson W. & Mann N. H. (1997) Lysogenic and lytic viral production in marine microbial communities. *Aquatic Microbial Ecology*, **13**, 95-100.
- Wilson W. H., Schroeder D. C., Allen M. J., Holden M. T. G., Parkhill J., Barrell B. G., Churcher C., Hamlin N., Mungall K., Norbertczak H., Quail M. A., Price C., Rabinowitsch E., Walker D., Craigon M., Roy D. & Ghazal P. (2005) A large virus that infects marine algae unexpectedly harbors genes for apoptosis and transcription, thought to be absent from viruses. *Science*, **12**, 1090-1092.
- Winter C., Smit A., Herndl G. J. & Weinbauer M. G. (2004) Impact of viroplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 804-813.
- Winter C., Smit A., Herndl G. J. & Weinbauer M. G. (2005) Linking bacterial richness with viral abundance and prokaryotic activity. *Limnology and Oceanography*, **50**, 968-977.
- Woese C. R. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceeding of National Academy of Science USA*, **97**, 8392-8396.
- Wommack K. E. & Colwell R. R. (2000) Viroplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 69-114.
- Wommack K. E., Ravel J., Hill R. T., Chun J. & Colwell R. R. (1999) Population dynamics of Chesapeake Bay Viroplankton: total-community analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 231-240.
- Worden A. Z. & Binder B. J. (2003) Application of dilution experiments for measuring growth and mortality rates among *Prochlorococcus* and *Synechococcus* populations in oligotrophic environments. *Aquatic Microbial Ecology*, **30**, 159-174.
- Xenopoulos M. A. & Bird D. F. (1997) Virus à la sauce Yo-Pro: Microwave-enhanced staining for counting viruses by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography*, **42**, 1648-1650.
- Yokokawa T. & Nagata T. (2005) Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6799-6807.
- Zubkov M. V., Burkill P. H. & Topping J. N. (2007) Flow cytometric enumeration of DNA-stained oceanic planktonic protists. *Journal of Plankton Research*, **29**, 79-86.
- Zweifel U. L., Norrman B. & Hagstrom A. (1993) Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Marine Ecology Progress Series*, **101**, 23-32.

ANNEXES



Entretien avec Evelyn Fox Keller :
« Pas de lois universelles en biologie ! »

AVRIL 2007
N° 407

L'ACTUALITÉ DES SCIENCES

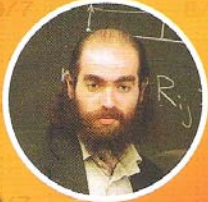
La Recherche

ASTRES MATIÈRE TERRE VIE ARCHÉOLOGIE SAPIENS SANTÉ TECHNOLOGIES MATHÉMATIQUES

NOUVEAU
Cahier technologique
Le futur du pétrole



Les problèmes difficiles en mathématiques



DOSSIER p. 30



Comment la conjecture de Poincaré a été démontrée



POLITIQUE Présidentielle, questions de science p. 42

Bac to basics
LES DENTS

Comment ça marche
LA MACHINE
À VOTER

W^{xyz} DES SOLUTIONS
POUR FAIRE
BONNE FIGURE

Jeux DANS
LA TASSE
DES LECTEURS

T 01108 - 407 - F: 6,00 €

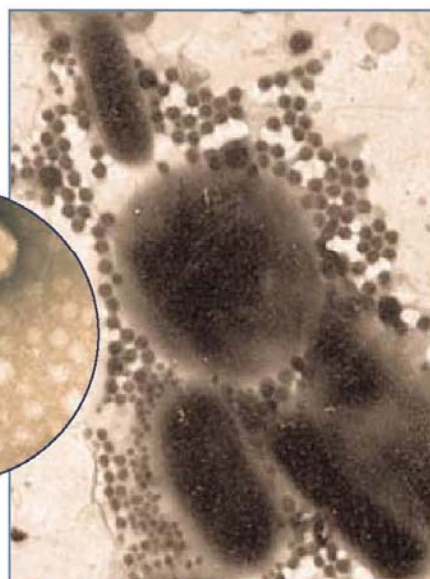


ÉCOLOGIE

■ **EN DEUX MOTS** ■ L'existence et l'abondance des virus aquatiques ont été longtemps méconnues. Aujourd'hui on pense qu'il en existe probablement des centaines de milliers d'espèces. Et les techniques

d'exploration du génome nous dévoilent les multiples interactions qu'entretiennent ces virus avec leurs hôtes, les bactéries et les micro-algues qui sont au cœur des cycles biogéochimiques de la planète.

• Les virus, chefs d'orchestre aquatiques



© MIKAL HELDAL - JONATHAN COLOMBET

CES BACTÉRIES MASSIVES, ainsi que les virus qui les entourent (petits points sombres), proviennent du Raunefjord, à 20 kilomètres au sud de Bergen, en Norvège. Le bactériophage à la longue queue typique (en cartouche) provient, lui, du lac Pavin, en Auvergne.

Ils sont présents à raison de 1 à 1 000 millions d'individus dans une cuillère à café d'eau de mer ou d'eau douce ! Pourtant, on commence tout juste à apprécier l'importance des virus aquatiques dans la biodiversité bactérienne, voire le climat.

Stéphan Jacquet est chargé de recherche à l'INRA de Thonon-les-Bains. Il a créé et anime le réseau Ravage (Réseau français de virologie aquatique en génomique et écologie).
jacquet@thonon.inra.fr

Sébastien Personnic achève sa thèse dans l'équipe de Stéphan Jacquet.

Océans, mers, estuaires, golfes, lacs, rivières, lagunes, glaces, sédiments : les virus aquatiques sont partout. Qui plus est, en quantité phénoménale : 1 million à 1 milliard de particules par millilitre ! Soit, pour une cuillère à café d'eau marine ou d'eau douce, de 1 à 1 000 millions de virus... Pourtant, il y a seulement vingt ans, leur existence était considérée comme anecdotique. Il faut dire que les équipements permettant de repérer les plus petits des organismes aquatiques étaient alors peu nombreux, et que les microbiologistes spécialistes d'écologie aquatique préféraient concentrer leurs efforts sur les bactéries, elles-mêmes peu connues dans ces biotopes. Aussi, lorsque deux microbiologistes de l'université de l'Oregon livrèrent en 1979 la première estimation semi-quantitative de virus présents dans les eaux de Yaquina Bay, au nord-ouest des États-Unis, leurs résultats ne reçurent-ils pas grand écho [1]. Il fallut attendre 1989 pour

que soient publiés les premiers résultats de microscopie électronique à transmission témoignant du foisonnement de virus dans différents milieux aquatiques [2].

Abondance

Les auteurs de ces travaux, Mikal Heldal et ses collaborateurs de l'université de Bergen, en Norvège, avançaient alors le chiffre de 4 à 10 millions de virus par millilitre d'eau, qualifiant dans la foulée les virus d'entité biologique la plus abondante de notre planète : plus importante en nombre que les bactéries ! L'hypothèse fut validée dans les années qui suivirent, grâce à l'essor des techniques de dénombrement – la microscopie électronique à transmission, la microscopie à épifluorescence, ou encore la cytométrie en flux. Il apparut aussi que cette abondance varie considérablement selon la profondeur, l'éloignement des côtes ou encore le statut trophique de l'écosystème (lire « Des virus partout », ci-contre).

Les scientifiques, s'ils furent surpris, furent aussi satisfaits par ces découvertes. Car jusque-là certains phénomènes de mortalité bactérienne échappaient à l'explication classique: il était impossible de les imputer uniquement à l'action prédatrice des eucaryotes ciliés ou flagellés du zooplancton. Les virus constituaient un coupable plausible. En effet, ils ont impérativement besoin d'un organisme hôte pour se reproduire, et les bactéries semblaient d'excellents candidats. D'une part, en raison de leur abondance. Dans l'océan, leur densité moyenne avoisine 10^8 à 10^9 par litre (beaucoup plus dans certaines zones, beaucoup moins dans d'autres), ce qui en fait les plus nombreux des hôtes potentiels. Sachant que la rencontre entre un virus et son hôte est le fait du hasard, cette abondance est un paramètre clé. D'autre part, les observations de terrain montraient que l'abondance bactérienne était le meilleur facteur prédictif de l'abondance virale.

Très vite, au début des années 1990, des particules virales furent effectivement visualisées au sein de diverses bactéries aquatiques. Et l'on estime aujourd'hui que les virus spécifiques des bactéries (les «bactériophages» ou, plus simplement, «phages») sont les plus nombreux des virus aquatiques. Ils ne sont toutefois pas les seuls: d'autres virus infectent les micro-algues du phytoplancton, c'est-à-dire les eucaryotes unicellulaires capables d'effectuer la photosynthèse.

De tous ces virus nous ne connaissons encore aujourd'hui qu'une infime fraction. Car l'expérimentateur est confronté au même problème que celui posé pour bien des virus et bactéries «terrestres»: la difficulté à les faire proliférer *in vitro*. Dès lors, comment les identifier? Le développement de la «métagénomique» apporte une réponse. Cette approche d'étude de la biodiversité consiste à séquencer tout l'ADN

91 % des séquences virales repérées par l'analyse génomique étaient inconnues

présent dans un échantillon donné. La comparaison des séquences obtenues avec celles déjà répertoriées dans les bases de données met alors en évidence les organismes nouveaux.

Une telle investigation a été menée avec succès en 2006, par des collègues américains et canadiens [3]. Ils ont passé au crible 184 échantillons collectés au cours des dix années passées, dans 68 sites répartis dans la mer des Sargasses, le golfe du Mexique, les côtes de Colombie britannique et l'océan Arctique. Résultat: 91 % de toutes les séquences virales repérées étaient jusque-là inconnues! Qui plus est, leur ana-

lyse a montré que la plupart d'entre elles étaient présentes dans les différents biotopes étudiés, mais en proportions variables. Voilà qui conforte l'idée que chaque région a son

propre «biome viral» (on parle aussi de «virome»). L'adage selon lequel «tout est partout, mais l'environnement sélectionne» est ainsi vérifié. Pour les auteurs de l'étude, il existe probablement des centaines de milliers d'espèces virales dans l'océan, très largement distribuées à travers le monde, avec quelques régions contenant la majorité d'entre elles.

Saisonnalité

Des centaines de milliers d'espèces de virus à des concentrations souvent considérables! Quel peut donc être leur impact sur les populations de bactéries ou d'algues infectées? L'exemple des populations de *Vibrio cholerae*, bactéries responsables du choléra, est parlant. En 2005, Shah Faruque et ses collaborateurs de l'International Center for Diarrhoeal Disease Research de Dacca, au Bangladesh, ont étudié la dynamique de deux souches de *Vibrio cholerae*, pour mieux comprendre la saisonnalité des épidémies de choléra [4]. Ils ont vu que l'augmentation de bactéries

[1] F. Torrella et R.Y. Morita, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 774, 1979.

[2] O. Bergh et al., *Nature*, 340, 467, 1989.

[3] F. Angly et al., *PLoS Biol.*, 4(11), e406, 2006.

GÉOGRAPHIE Des virus partout

Globalement, l'abondance des virus aquatiques croît avec la productivité des systèmes. On rencontre des concentrations moyennes de 10^4 à 10^6 particules par millilitre dans l'océan profond (mais avec des pics dépassant largement 10^6 dans certains coins de l'océan profond ou de certains lacs), de 10^5 à 10^7 particules par millilitre dans l'eau de surface des zones offshore et de 10^6 à 10^8 particules par millilitre dans les zones côtières. Dans les zones estuariennes et dans les lacs très productifs, les concen-

trations peuvent dépasser les 10^8 particules par millilitre d'eau. C'est également le cas dans un milieu aussi extrême que les glaces de l'océan Arctique: les concentrations virales peuvent être supérieures à 10^8 particules par millilitre. Mais, de manière générale, la quantité de virus est plus importante dans les milieux d'eau douce que dans les milieux marins. Quant aux sédiments, ils sont eux aussi très riches en virus, en particulier à leur surface. Dans un gramme, on y trouve de $0,03$ à 12×10^9 particules virales.



L'ANALYSE D'ÉCHANTILLONS D'EAU prélevés à la surface du glacier Midre Løvenbreen, au Spitzberg (ci-dessus), a révélé la présence de bactéries infectées par des virus.

© CHRISTIN SANSTROM/AVAEA UNIV., SWEDEN

ÉCOLOGIE

[4] S.M. Faruque et al., *PNAS*, 102, 1702, 2005 ; S.M. Faruque et al., *PNAS*, 102, 6119, 2005.

[5] T.F. Thingstad et R. Lignell, *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 19, 1997.

[6] S. Jacquet et al., *Aquatic Microbial Ecology*, 27, 111, 2002.

⇒ pathogènes correspond dans un premier temps à une diminution du nombre des virus spécifiques de ces bactéries. Dans un second temps, le nombre de phages augmente, suivi peu après par un déclin de l'épidémie. Puis la population bactérienne augmente à nouveau. Ce phénomène cyclique tient à l'augmentation exponentielle du nombre de virus une fois que la quantité de bactéries hôtes atteint un certain seuil. Arrive un moment où les phages finissent par avoir raison de ces bactéries – ce qui, indirectement, entraîne la baisse de leur propre population.

Voilà qui illustre un concept fondamental en écologie virale aquatique : « Que le vainqueur meure ! » Élaboré en 1997 par Frede Thingstad, de l'université de Bergen, en Norvège, il permet d'expliquer la coexistence, dans le temps, d'espèces bactériennes dominées avec des espèces dominantes [5]. Le fait qu'une population bactérienne donnée ne puisse, à cause des phages, croître à l'infini lorsqu'elle se trouve dans des conditions favorables, permet en effet la conservation d'une diversité bactérienne maximale en dépit des fluctuations environnementales favorisant tantôt une population, tantôt une autre. Pour Frede Thingstad : « Les virus, qui sont le plus souvent spécifiques de l'espèce, voire de la souche, sont donc les



EN PROVOQUANT LE MÉLANGE entre eau potable et excréments, les inondations (id au Bangladesh) favorisent les épidémies de choléra. Les populations de bactéries cholériques sont régulées par des virus.

candidats privilégiés pour maintenir cette biodiversité planctonique, qui est longtemps restée une énigme scientifique. » Parce qu'elle permet d'expliquer la survie de multiples espèces dans des milieux où les ressources sont souvent limitées, et qu'elle a été plusieurs fois observée en conditions expérimentales, la théorie « killing the winner » est aujourd'hui largement acceptée par les aquavirologistes.

Agent de biodiversité

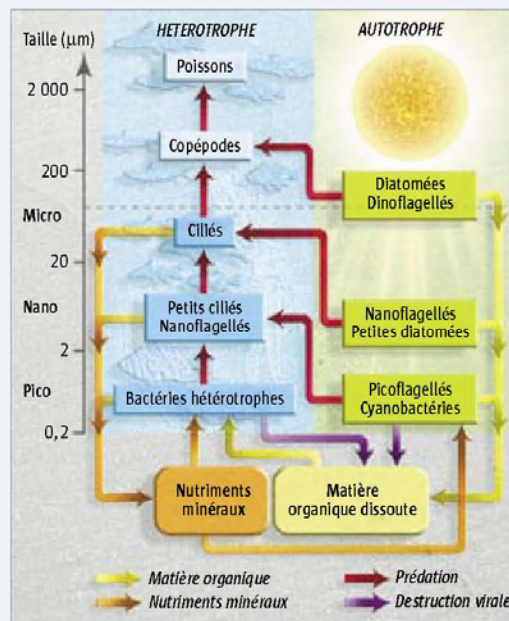
Cette théorie vaut aussi lorsque les cibles de l'infection sont des micro-algues. L'équipe de Keizo Nagasaki, de la « Fisheries Research Agency » au Japon, et l'un d'entre nous alors dans l'équipe de Gunnar Bratbak, en Norvège [6], avons en effet montré que l'infection virale est, après la saisonnalité, l'un des facteurs les plus importants qui affectent la dynamique des algues, autrement dit la taille et la périodicité de leurs efflorescences. L'algue phytoplanctonique *Heterosigma akashiwo* constitue un exemple particulièrement frappant. Chaque année, sa prolifération dans la baie d'Hiroshima provoque la mort de milliers de tonnes de poissons. Mais chaque année également des virus ramènent les populations algales à des dimensions plus modestes, venant ainsi au secours des pêcheurs. En régulant les populations, les virus contribuent donc au maintien

ALIMENTATION

Réseau trophique

LES ORGANISMES DU PHYTOPLANKTON

(en vert) sont à la base de la chaîne trophique classique : ils fabriquent leur propre matière organique en fixant le dioxyde de carbone atmosphérique par photosynthèse et puisent dans l'eau des minéraux (en orange). La matière organique dissoute qu'ils libèrent (en jaune) sert de nourriture aux bactéries hétérotrophes, incapables d'effectuer la photosynthèse. Ces bactéries sont ensuite consommées par des nanoflagellés et des petits ciliés prédateurs, qui chassent aussi les plus petits organismes photosynthétiques (cyanobactéries et picoflagellés). Les petits prédateurs sont ensuite la proie de plus grands – et ainsi de suite. À chaque stade, des débris organiques (non figurés ici) et des nutriments minéraux sont relâchés. Les virus jouent un rôle fondamental dans cette chaîne : en détruisant les bactéries hétérotrophes, les cyanobactéries, et certains autres organismes photosynthétiques, ils enrichissent le pool de matière organique dissoute.



de la diversité des bactéries et des algues. Mais il se pourrait bien qu'ils interviennent aussi dans la genèse régulière d'une nouvelle biodiversité. Comment? En favorisant les transferts de gènes entre bactéries. En effet, la mort des bactéries, conclusion de l'infection virale, libère des fragments d'ADN bactérien qui peuvent être récupérés par d'autres bactéries. Par ailleurs, les virus qui infectent un hôte peuvent incorporer une partie de son matériel génétique au leur, et l'injecter ensuite à une autre cible.

Un exemple particulièrement intéressant de tels transferts de gènes intervient entre les bactéries *Prochlorococcus* ou *Synechococcus* et leurs phages respectifs. Toutes deux jouent un rôle écologique de première importance : ces bactéries photosynthétiques, ou cyanobactéries, accomplissent une grande part de la photosynthèse océanique, laquelle représente la moitié de la photosynthèse planétaire. Or, en 2003, Nick Mann et ses collaborateurs de l'université de Warwick en Grande-Bretagne ont montré que les phages infec-

qui se traduit par l'arrêt de l'activité photosynthétique bactérienne au bout d'un certain temps, et donc par l'arrêt de toute activité métabolique. Le maintien de l'activité photosynthétique, induit par les deux gènes véhiculés par le phage, est donc tout bénéfique pour ce virus : il peut continuer à utiliser la machinerie cellulaire pour se répliquer jusqu'au dernier moment [10]. Cela montre que si les populations bactériennes peuvent se diversifier et évoluer grâce à leurs interactions avec les phages, l'inverse est également vrai.

Action sur le climat

L'impact des virus aquatiques ne s'arrête pas là. En tuant 10 % à 50 % de la biomasse bactérienne produite chaque jour, ils interviennent sur ces processus fondamentaux que sont les cycles biogéochimiques [11]. En effet, bon nombre des bactéries qu'ils infectent sont au cœur de ces cycles. Il s'agit des bactéries hétérotrophes : dépourvues de toute capacité photosynthétique, elles se procurent leurs ressources énergétiques en consommant une fraction importante des déchets du phytoplancton, ou des débris générés par d'autres organismes. Ainsi nourries, ces bactéries prolifèrent, et produisent du dioxyde de carbone (CO_2) qui est ensuite restitué à l'atmosphère.

Dès lors, on discerne l'impact potentiel des bactériophages : en tuant ces bactéries hétérotrophes, ils diminuent la quantité de CO_2 relargué dans l'atmosphère. Sans eux, l'effet de serre engendré par le CO_2 serait donc plus important qu'il ne l'est ! Peut-être exercent-ils également cet effet modérateur via leur action létale sur l'algue unicellulaire photosynthétique *Emiliana huxleyi*. Très abondante par endroits, par exemple dans l'Atlantique Nord, cette algue peut former de très grandes efflorescences bien visibles par satellite. Quand elle meurt, elle libère du sulfure de diméthyle, ou DMS, qui une fois oxydé dans l'atmosphère devient

un aérosol sulfuré favorisant la condensation de gouttelettes d'eau dans l'atmosphère. Le DMS favorise ainsi la formation de nuages, qui exercent un « effet parasol » antagoniste de l'effet de serre. En tuant *Emiliana*, les virus contribueraient donc à l'effet parasol... Certes, les données manquent encore pour déterminer l'impact des virus aquatiques sur la biodiversité d'une part, sur la machine climatique d'autre part. Quoi qu'il en soit, il est à parier que les virus aquatiques seront bientôt considérés avec une attention digne de celle aujourd'hui réservée aux bactéries ! ■ S. J. et S. P.



CES EFFLORESCENCES TURQUOISE de l'algue *Emiliana huxleyi* au large des Cornouailles ont été visualisées par satellite, grâce à la lumière réfléchie par sa coquille calcaire. Sa destruction par certains virus aquatiques aboutit à la libération de sulfure de diméthyle, qui exerce un effet parasol antagoniste de l'effet de serre. © LANDSAT 7 IMAGE PROCESSING BY STEVE GROOM, PLYMOUTH MARINE LABORATORY

tant *Synechococcus* pouvaient intégrer jusqu'à 8 % de l'ADN de leur hôte [7]. Plus étonnant encore, ces phages possèdent deux gènes codant des composants clés de l'appareil photosynthétique de la bactérie [8]. Ce constat vaut également chez *Prochlorococcus*, comme l'a montré en 2004 l'équipe de Sallie Chisholm, au Massachusetts Institute of Technology [9]. L'hypothèse la plus probable est qu'ils les ont récupérés chez leur hôte, puis les ont gardés. Il faut dire que l'expression de ces protéines codées par le génome viral permet aux cellules infectées de passer outre le phénomène dit de « photosensibilisation ». Un phénomène

[7] M.R.J. Clokie et al., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 46, 349, 2003.

[8] N.H. Mann et al., *Nature*, 424, 741, 2003.

[9] D. Lindell et al., *PNAS*, 101, 11013, 2004.

[10] D. Lindell et al., *Nature*, 438, 86, 2005.

[11] J.A. Fuhrman, *Nature*, 399, 541, 1999.

POUR EN SAVOIR PLUS

- Curtis Suttle, *Nature*, 437, 356, 2005.
- Christon Hurst (dir.), *Viral Ecology*, Academic Press, 2000.
- Edward DeLong, « Mille milliards de mille microbes », *La Recherche*, juillet-août 2002, p. 54.
- <http://virusécologie.free.fr/index.htm>
- www.thonon.inra.fr/EWAPE1/index.htm
- www.bio.utk.edu/wilhelm/SCOR.html
- www.phage.org

LE COURRIER DE L' ENVIRON NEMENT DE L'INRA

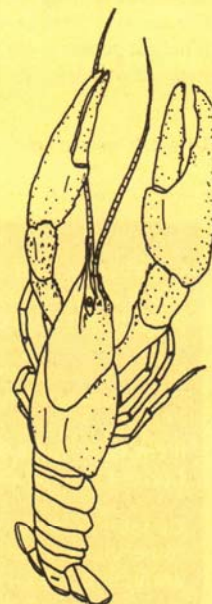
décembre 2006

n°53

- **La production fruitière intégrée en France**
par Stéphane Bellon *et al.*
- **Les virus planctoniques**
par Stéphan Jacquet *et al.*
- **Épandage de boues d'épuration urbaines sur des terres agricoles**
par Denis Baize *et al.*
- **Innovation phytosanitaire et consommation de produits par l'agriculture**
par Jean-Louis Bernard et Virginie Rameil
- **Vers une alimentation durable ? Ce qu'enseigne la littérature scientifique**
par Barbara Redlingshöfer

■ **Repères**

Jacques Lecomte (Quelques considérations sur le développement durable...);
Pierre-Frédéric Ténière-Buchot (L'expertise sécheresse); **Elmar Schlich**
(La consommation d'énergie finale de différents produits alimentaires);
Carole Barthélémy (Du mangeur d'aloses au carliste sportif); **Jean-Claude Génot**
(Vers un changement climacique ?); **Patricia Jean** (Une candide au sein d'un débat public).



MISSION ENVIRONNEMENT-SOCIÉTÉ
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
147 rue de l'Université, 75338 Paris cedex 07

les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques

Sébastien Personnic¹, Solange Duhamel^{1,2}, Yvan Bettarel³,
Télesphore Sime-Ngando⁴, Stéphan Jacquet¹

¹INRA UMR 42, Centre alpin de recherche sur les réseaux trophiques des écosystèmes limniques, station INRA d'hydrobiologie lacustre, équipe d'écologie microbienne aquatique, 75 avenue de Corzent, 74203 Thonon-les-Bains

²Centre d'océanologie de Marseille, CNRS, UMR 6117, laboratoire de Microbiologie/géochimie/écologie marine (LMGEM), parc scientifique et technologique de Luminy, 13288 Marseille

³Centre IRD de Bel Air, BP 1386, Dakar, Sénégal

⁴CNRS, UMR 6023, laboratoire de Biologie des protistes, université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand 2), 63177 Aubière

jacquet@thonon.inra.fr ; tel : 04 50 26 78 12 ; fax : 04 50 26 07 60

Les virus constituent l'entité biologique la plus abondante dans les écosystèmes aquatiques. Ce sont, on le sait, des parasites obligatoires capables d'infecter potentiellement toutes les cellules vivantes (de la cellule humaine à la bactérie) et l'on reconnaît aujourd'hui que les conséquences de leurs activités sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques sont considérables. Les virus interviennent dans de nombreux processus écologiques et biogéochimiques, tels que le recyclage des nutriments, la mortalité bactérienne et algale, et affectent également la diversité de l'ensemble du compartiment microbien de manière directe ou indirecte. Cet article a pour but de dresser l'état des connaissances de l'écologie des virus planctoniques, acquises au cours des 15 dernières années avec le développement d'outils méthodologiques toujours plus performants.

Introduction

Les microorganismes jouent un rôle prépondérant dans les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques. L'écologie microbienne aquatique s'intéresse aux microorganismes qui peuplent les milieux aquatiques aussi bien dulçaquicoles que marins. Au sein des microorganismes, nous distinguons les bactéries auto- et hétérotrophes, les protistes auto- et hétérotrophes, ainsi que les champignons dont nous ne ferons pas état dans cet article. À ces compartiments aquatiques microscopiques, nous ajoutons les virus, qui ne constituent pas des microorganismes *sensu stricto* puisqu'ils sont dépourvus de métabolisme autonome (encadré 1). L'écologie virale étudie les interactions entre les virus et leur environnement physique, chimique et biologique. La microscopie électronique à transmission a permis de démontrer l'importance quantitative des virus aquatiques libres, notamment dans les écosystèmes marins où l'on a compté plus de 10 000 particules virales par millilitre (Torella et Morita, 1979). Et ce n'était qu'un début !



Aujourd'hui, avec le développement de méthodes de plus en plus performantes pour estimer les abondances et la diversité des virus, on sait que ces particules sont présentes dans tous les écosystèmes aquatiques (océans, mers, estuaires, golfes, lacs, rivières, lagunes, sources hydrothermales, sédiments, glace, etc.), à toutes les latitudes (polaires, tempérées, tropicales) et à tous les niveaux trophiques, des plus pauvres aux plus riches en termes de nutriments par exemple (Fuhrman et Suttle, 1993 ; Wommack et Colwell 2000 ; Sime- Ngando *et al.*, 2003 ; Weinbauer, 2004). Quelle que soit la méthodologie employée, leurs concentrations naturelles dépassent généralement 1 à 10 millions de particules par millilitre d'eau, et toujours, sauf rares exceptions, celles des bactéries. C'est typiquement le cas de tous les écosystèmes lacustres que nous étudions à Thonon-les-Bains (lacs Léman, du Bourget et d'Annecy) mais il est vrai que ces valeurs sont « écosystème-dépendantes ». Néanmoins, on reconnaît aujourd'hui que les virus constituent l'entité biologique la plus abondante dans les écosystèmes aquatiques. Cette importance quantitative du viroplankton a naturellement amené les chercheurs à étudier le rôle de ces particules dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

Encadré 1 : Micro-organismes et virus

Virus : particule microscopique constituée simplement d'un génome (ADN ou ARN) enveloppé par une coque ou membrane protéique (capside). Parasites obligatoires, les virus ont besoin d'un hôte spécifique pour se multiplier. Des maladies, comme la grippe, la varicelle mais aussi le SIDA, sont provoquées par des virus. Outre l'homme, les animaux et les plantes, les microorganismes de l'environnement sont sensibles aux infections virales.

Bactérie : être vivant unicellulaire dépourvu de noyau (e.g. procaryote).

Phage : syn. virus de bactérie, terme utilisé pour caractériser les virus de bactéries hétérotrophes (bactériophages) et autotrophes (cyanophages).

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

Hétérotrophe : désigne un organisme incapable d'utiliser directement les éléments minéraux simples (en théorie), ayant recours à la consommation de la matière organique pour ses besoins énergétiques.

Protiste : être vivant unicellulaire pourvu d'un noyau (e.g. eucaryote). Les algues microscopiques aquatiques qui forment l'essentiel du phytoplancton appartiennent au règne des protistes autotrophes. Les protistes hétérotrophes sont les protozoaires.

Champignon : être vivant hétérotrophe pluricellulaire dont les cellules sont pourvues d'un noyau différencié et d'une paroi. Organismes classés dans un règne à part, celui des Fungi.

La microscopie électronique à transmission a permis d'identifier des particules virales à l'intérieur de microorganismes aussi diversifiés que les bactéries, les cyanobactéries ou encore les micro-algues. On sait maintenant que les microorganismes représentent les principales cibles pour l'infection virale en raison de leur forte abondance naturelle et donc de la probabilité élevée de rencontre avec un virus.

Les virus représentent une cause importante de la mortalité des microorganismes en milieu aquatique.

D'autre part, en tant que réservoirs extracellulaires du patrimoine génétique de leurs cellules hôtes, ils représentent de véritables vecteurs de transfert horizontal de gènes entre différentes populations ou souches de microorganismes présents dans les écosystèmes aquatiques.

Nous sommes donc, sans aucun doute, en présence d'agents dont l'impact sur la composition, la diversité, la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques est considérable. Et encore largement insoupçonné ! Voir les revues complètes de : Fuhrman, 1999 ; Wommack et Colwell, 2000 ; Weinbauer, 2004 ; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004 ; Suttle, 2005.

Qu'est-ce qu'un virus ?

Les virus représentent les plus petites entités biologiques connues à ce jour, avec une taille variant généralement entre 20 et 200 nanomètres (majorité <60 nm). Cette limite des 200 nm est aujourd'hui remise en question avec la découverte de virus dont la taille peut atteindre 400 nm, comme les Mimivirus (Raoult *et al.*, 2004)¹. Les virus sont des agents infectieux dont l'organisation structurelle est simple et acellulaire. Un virus est constitué d'au moins un acide nucléique (ADN ou ARN simple ou double brin) entouré par une coque protéique ou capside. La capside est une structure moléculaire faite de nombreuses copies d'une ou de quelques sous-unités protéiques ou protomères. Elle protège le matériel génétique et favorise son transfert d'une cellule hôte à une autre. On distingue trois grands types morphologiques de virions (particules virales) : virus à capside icosaédrique, hélicoïdale, virus à enveloppe.

On estime qu'en moyenne les virus sont composés pour moitié par l'acide nucléique et pour moitié par des protéines. Un virus bactériophage contiendrait environ 0,08 fentogrammes d'ADN (contre 2,6 pour les bactéries). Cela nous laisse néanmoins entrevoir l'importance des éléments azotés et phosphorés pour ces particules. Les virus ne présentent aucune forme de métabolisme autonome. Pour tout processus requérant de l'énergie, y compris la réplication, ils doivent avoir recours à une cellule hôte sensible et permmissible.

Le cycle de réplication chez les virus comprend 4 étapes fondamentales :

- la fixation (adsorption), la pénétration (*via* un récepteur membranaire généralement impliqué dans la prise de nutriments) et la décapsidation ;
- la réplication (duplication du génome, transcription, traduction) ;
- l'assemblage des constituants viraux ;
- la libération des virus nouvellement formés.

Ce cycle en quatre étapes est dit de type lytique quand la libération des virus se fait par lyse (éclatement) de la cellule hôte et de type chronique quand elle se fait par bourgeonnement ou par extrusion de filaments de la membrane de la cellule hôte. L'infection chronique comme le vrai parasitisme affecte aussi le métabolisme cellulaire mais contrairement au cycle lytique, les cellules ne sont pas lysées.

Les étapes de réplication, assemblage et libération de néovirus ne sont pas forcément immédiates après l'introduction du virus dans la cellule hôte. En effet, l'ADN du virus peut s'intégrer dans le génome (ADN) de la cellule hôte, formant un « provirus ». Ce dernier va se reproduire lors du cycle de réplication de l'ADN de la cellule « infectée » et être transmis à de multiples générations. Ce cycle viral caractérisé par la formation d'un « provirus » est appelé cycle lysogénique. Le provirus peut être activé par la modification de facteurs environnementaux et reprendre un cycle lytique, avec réplication du génome viral, assemblages et lyse de la cellule hôte. Notons enfin le décalage entre les virus et les autres organismes en termes de nombre de gènes présents. En moyenne, on dénombre 165 gènes (par exemple pour le virus ADN T4) alors qu'une bactérie en contient près de 4 000, une cellule humaine environ 20 000. Mais on découvre aujourd'hui de nouveaux virus, notamment dans le milieu aquatique, dont le nombre de gènes est bien plus important et dont les fonctions rappellent celles des cellules eucaryotes.

¹ Ce virus, avec une taille de génome de 1,2 mégabase, pourrait être à l'origine d'une modification de notre conception de l'arbre phylogénétique eucaryotes-eubactéries-archaeobactéries.

Quels hôtes pour les virus aquatiques ?

Un virus est généralement spécifique d'une cellule hôte donnée. Il est donc caractéristique d'une espèce, voire d'une variété ou souche de cette espèce. Ainsi, certains virus s'attaquent spécifiquement aux procaryotes (bactériophages, encadré 2), les cyanobactéries y compris (cyanophages), aux plantes, aux animaux ou aux hommes. On sait aujourd'hui que les Bactéries (*Bacteria*) et les Archébactéries (*Archaea*) sont les cellules les plus abondantes dans les écosystèmes aquatiques ; il est donc naturellement admis que la majeure partie de la communauté virale est composée de bactériophages (Fuhrman, 1999 ; Wommack et Colwell, 2000 ; Weinbauer, 2004). Sachant que les milieux aquatiques constituent la plus grande partie de la « biosphère » de notre planète, il est alors logique de penser que les phages marins et d'eaux douces sont probablement les entités biologiques les plus abondantes sur terre (Paul *et al.*, 2002 ; Sime-Ngando *et al.*, 2003). Les bactériophages sont le groupe de virus le plus important par le nombre de descriptions (Ackermann, 2003). Ils sont représentés chez les Archées et les Bactéries et ils ont colonisé tous les habitats connus (Ackermann et Dubow, 1987 ; Wommack et Colwell, 2000). Dans les systèmes aquatiques, l'abondance et la dynamique virales commencent à être assez bien documentées, surtout dans la zone pélagique. Les virus du sédiment (zone benthique) sont beaucoup plus difficiles à étudier que ceux de la colonne d'eau. En effet, dans le sédiment, les particules virales sont généralement adsorbées sur les particules organiques et minérales. Or les sédiments aquatiques accueillent une grande partie de la biomasse et de la biodiversité bactériennes et jouent un rôle principal dans les cycles biogéochimiques. La découverte de l'abondance du viriobenthos, jusqu'à 1 000 fois plus élevée que l'abondance du virioplancton, a accru l'intérêt de la communauté scientifique pour l'étude de ce compartiment (Paul *et al.*, 1993 ; Maranger et Bird, 1996 ; Danovaro *et al.*, 1999). Pour Mei et Danovaro (2004) les taux élevés de production de virus benthiques peuvent avoir un effet significatif sur la dynamique bactérienne benthique et la production de virus devrait être incluse dans les modèles biogéochimiques des sédiments aquatiques. Middleboe et ses co-auteurs ont enregistré une forte activité virale dans les sédiments, ce qui présente des implications importantes pour le recyclage du carbone dans les écosystèmes aquatiques (Glud et Middleboe, 2004 ; Middleboe *et al.*, 2003). Dans les lacs, ce n'est pas forcément vrai néanmoins (Duhamel et Jacquet, 2006 ; Bettarel *et al.*, 2006 ; Filippini *et al.*, 2006). De très faibles taux d'infection semblent plutôt être la règle.

Encadré 2 : Un peu d'histoire des bactériophages

Pendant la Première Guerre mondiale, le microbiologiste Félix d'Hérelle examine des soldats atteints de dysenterie. Certains malades arrivent à vaincre cette maladie, alors que d'autres n'y arrivent pas. D'Hérelle en trouve la raison : les bactéries sont attaquées et détruites par un ennemi naturel, qu'il nomme « bactériophage » (littéralement mangeur de bactéries). Il s'agit d'un virus ! En « s'agrippant » à la bactérie, les bactériophages lui injectent leur matériel génétique, provoquant la synthèse de nouveaux virus intracellulaires jusqu'à l'éclatement de la cellule, devenue trop petite pour abriter une telle densité de phages. L'invasion se poursuit tant qu'il reste des bactéries. Les observations de Félix d'Hérelle sont présentées devant les membres de l'Institut Pasteur en 1917, deux ans après que le bactériologiste anglais, William Twort, ait lui-même noté l'action de cet agent jusque-là inconnu. La découverte de Félix d'Hérelle suscite bien des espoirs sur le plan thérapeutique (voir plus loin : la thérapie phagique). L'étude des bactériophages contribua à la naissance de la biologie moléculaire. Aujourd'hui, les Rétrovirus, les Adénovirus et les Herpèsvirus sont principalement utilisés comme vecteurs viraux défectifs dans les transferts de gènes thérapeutiques (thérapie génique) alors que les Bactériophages sont principalement utilisés dans le transfert, l'expression et la répllication d'ADN étranger dans une cellule hôte en vue d'un clonage moléculaire.

Les grands groupes de virus et la diversité virale

Le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) a établi depuis 1966 un système universel de classification des virus. Le système utilise les taxa connus. Les virus ne forment pas un règne comme tel et, pour la plupart des scientifiques, ne sont même pas considérés comme des organismes vivants, mais la découverte des Mimivirus et d'autres virus géants, dont les gènes préfigurent ou

ressemblent à ceux des cellules eucaryotes, pourrait modifier cela ! Face à cette complexité taxonomique, on utilise de préférence le terme de particules virales. Le concept « d'espèce » leur est néanmoins appliqué. Une espèce virale est définie comme « ... une classe polyphylétique (classe fondée sur des convergences au sein de laquelle il manque l'ancêtre commun à tous ses membres) de virus qui constitue une lignée qui se reproduit et occupe une niche écologique particulière » (Regenmortel, 1992).

Actuellement les « espèces » virales sont classées selon 5 principaux critères : la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN) ; le nombre de brins dont il est constitué ; la présence ou non d'une enveloppe autour de la capsid ; la symétrie de la capsid (hélicoïdale ou icosaédrique) ; la taille du virus. La microscopie électronique à transmission est couramment utilisée pour apprécier cette diversité morphologique. En milieu aquatique, le diamètre de la capsid des virus est généralement inférieur à 100 nm (sauf pour les virus de microalgues) et possède une queue de longueur variable. Plus de 5 100 bactériophages ont été examinés en microscopie électronique depuis 1959, révélant qu'environ 96 % des phages présentent une queue (contractile ou non) et que seulement 3,6 % sont cubiques, filamenteux ou pléomorphes (Ackermann, 2001). Cette connaissance limitée de la diversité du monde viral est clairement liée aux difficultés méthodologiques.

Depuis l'avènement des outils de la biologie moléculaire, de nombreuses études ont révélé l'incroyable diversité virale de cyanobactéries et/ou de microalgues par exemple (Suttle, 2000 ; Breitbart *et al.*, 2002 ; Venter *et al.*, 2004). Comme il n'y a pas de gène universel commun à l'ensemble des virus, il n'est pas possible d'accéder à la diversité virale non cultivable en utilisant des approches analogues au profilage de l'ADN ribosomal, comme cela est classiquement établi pour les bactéries. Aujourd'hui, les analyses de type métagénomique des communautés virales permettent de contourner ce problème et peuvent fournir de nombreux détails sur la structure et la composition des communautés naturelles (Edwards et Rohwer, 2005). Breitbart *et al.* (2002) ont évalué le nombre de génotypes viraux à plus de 7 000 dans un échantillon d'eau de mer côtière de seulement 200 litres. Cette estimation surpasse celles données pour la diversité bactérienne et vient conforter l'idée que la diversité virale est probablement énorme et très largement insoupçonnée. De plus, cette valeur est en accord avec le rapport d'abondance de 10 virus pour 1 bactérie généralement enregistré dans les eaux côtières de surface (Wommack et Colwell, 2000). Il y aurait en moyenne environ 10 virus spécifiques pour une espèce bactérienne donnée.

Comment compter les virus aquatiques ?

Suivant le degré trophique des écosystèmes aquatiques, la saison et encore la profondeur des prélèvements, les concentrations en virus libres évoluent généralement et en moyenne entre 10⁵ et 10⁸ particules par millilitre. Aujourd'hui, le dénombrement des virus planctoniques s'effectue essentiellement à l'aide de trois approches méthodologiques réalisées au moyen de trois techniques différentes.

La microscopie électronique à transmission permet de dénombrer les virus, de caractériser leur morphologie et d'estimer l'importance relative des cellules bactériennes infectées. Cette technique, à la fois globale et invasive, permet d'accéder à des paramètres clefs qu'aucune des deux autres techniques ne peut renseigner (charge cellulaire en virus, pourcentage de mortalité induite par action virale).

La microscopie à épifluorescence, après coloration des acides nucléiques par des marqueurs fluorescents extrêmement sensibles, permet d'effectuer le dénombrement des virus libres (Fuhrman et Noble, 1995 ; Bettarel *et al.*, 2000).

Plus récemment, des protocoles de dénombrement des virus libres en cytométrie en flux ont été développés dans certains laboratoires dont le nôtre.

L'utilisation des sondes fluorescentes, marquant les acides nucléiques, permet une différenciation fiable des populations virales et bactériennes avec les débris et autres particules en suspension, donc de détecter de nombreuses populations ou groupes de virus. Nous cherchons actuellement à identifier quelle signature relève des bactériophages, des cyanophages, des virus de microalgues. Dans quelles proportions ? Peut-on établir une règle générale ? Nous avons comparé l'efficacité de comptage des virus bactériophages libres d'échantillons naturels aquatiques, à partir de ces trois techniques, sur des échantillons du lac du Bourget, prélevés et conditionnés de la même manière entre trois laboratoires indépendants. Des comptages ont été faits en double aveugle par différents scientifiques. Et qu'avons-nous trouvé ? Des différences significatives entre les différentes méthodes de comptage, qui révèlent combien les comparaisons entre écosystèmes sont difficiles, ce que pourtant la littérature scientifique propose sans se poser trop de questions ! Il n'y a malheureusement pas de solution réelle à ce problème. Et l'avoir en tête n'est déjà pas si mal.

Le dénombrement des virus du sédiment implique une extraction délicate pour les séparer de la matière sédimentaire. Après Drake *et al.* (1998), Danovaro *et al.* (2001) ont mené l'un des premiers travaux sur le sujet en milieu marin. En nous basant sur leur protocole pour la détermination des abondances virales, nous avons pu optimiser la technique de comptage et trouvé des concentrations très élevées de bactéries et de virus dans les premiers centimètres des sédiments des lacs Léman et du Bourget (Duhamel et Jacquet, 2006).

Nous ne développons pas ici d'autres méthodes de quantification virale spécifiques d'un virus ou d'une famille de virus en particulier. Les techniques de comptage avec leurs avantages et leurs désavantages sont consultables sur Internet : <http://jacquet.stephan.free.fr/diaporamas.htm>

Rôles fonctionnels des virus

Rôle fonctionnel dans les cycles biogéochimiques (boucle microbienne, flux de carbone)

La communauté microbienne n'a été prise en compte dans l'étude des grands cycles biogéochimiques que tardivement. Il faut attendre Azam *et al.* (1983) pour qu'apparaisse le concept de boucle microbienne (figure 1) et que le compartiment microbien soit reconnu comme clé dans le fonctionnement et la compréhension des processus biogéochimiques en milieu aquatique. La boucle microbienne est une voie de transfert du carbone dans les écosystèmes aquatiques, basée sur l'utilisation par les bactéries de la matière organique dissoute, issue notamment de l'excrétion phytoplanctonique (on parle d'exsudats). Le carbone bactérien entre alors dans la chaîne trophique *via* le broutage des bactéries par le protozooplancton et, éventuellement, par certains composants du métazooplancton. Quels rôles jouent les virus dans ces cycles et dans la boucle microbienne ? En lysant les microbes autotrophes et hétérotrophes, les phages modulent les flux de carbone au travers de la chaîne alimentaire (Fuhrman, 1999). Lorsqu'une cellule hôte est lysée, les virus libèrent ainsi que les débris cellulaires constituent des produits (protéines, acides nucléiques et autres composants cellulaires) riches en éléments azotés, phosphorés ou carbonés, potentiellement utilisables par les bactéries et le phytoplancton comme éléments nutritifs (Gobler *et al.*, 1997 ; Noble *et al.*, 1999). L'activité virale transforme donc le carbone particulaire en carbone dissous, court-circuitant ainsi le flux de carbone et de nutriments vers les consommateurs supérieurs de la chaîne alimentaire aquatique.

Pour illustrer ce concept, Wilhelm et Suttle (1999) ont démontré, en utilisant un modèle très simple, que 6 à 26 % du carbone organique fixé par photosynthèse est recyclé en matière organique dissoute par la lyse virale.

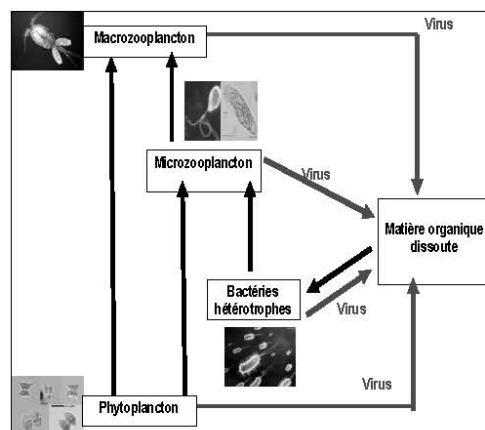


Figure 1. Le « court-circuit » viral dans la chaîne trophique microbienne aquatique. En milieu marin, le pourcentage de production de carbone issu de la lyse virale sur les bactéries hétérotrophes varie entre 8 % et 42 % du total au large et entre 6,8 % et 25 % dans les eaux côtières (d'après Wilhelm et Suttle, 1999).

Par ailleurs, les acides nucléiques sont des produits de la lyse virale riches en phosphore. Paul *et al.* (1991) suggèrent qu'entre 1 et 12 % de l'ADN total « dissous » dans l'eau de mer se trouve dans les virus. Aussi, sachant que les acides nucléiques sont des composés phosphorés et que le temps de renouvellement de l'ADN dans l'eau de mer est rapide, l'ADN viral encapsidé pourrait représenter un réservoir important de phosphore organique (Bratbak *et al.*, 1994).

Enfin, pour finir avec l'importance relative des virus dans les cycles biogéochimiques, nous pouvons citer Curtis Suttle, qui estime que dans les océans, les virus sont responsables de 20 % de la biomasse² produite chaque jour, ce qui est considérable ! Cette incidence sur la (re)distribution des nutriments dans les écosystèmes aquatiques constitue un pan clé de la recherche pour mieux comprendre la dynamique des populations planctoniques à la base des chaînes trophiques pélagiques. L'équipe INRA de Thonon-les-Bains commence à s'y intéresser au travers de la thèse de Lydia Berdjeb.

Effets sur les blooms phytoplanctoniques : vers un contrôle biologique ?

Plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux virus en tant qu'agents de contrôle des efflorescences algales (ou « blooms »). L'équipe de Keizo Nagasaki au Japon s'est ainsi penchée sur le contrôle des proliférations de l'algue phytoplanctonique toxique *Heterosigma akashiwo* dans la baie d'Hiroshima au Japon qui conduisent, chaque année à la mort de milliers de tonnes de poissons. Ils ont découvert que le principal facteur de contrôle de cette efflorescence était un virus. En 1999, ces auteurs envisageaient même d'utiliser industriellement le virus isolé de cette algue pour en contrôler les efflorescences (Nagasaki *et al.*, 1999). Toutefois, leurs travaux ont aussi révélé que l'intra-spécificité de son mode d'action semble être l'obstacle le plus sérieux à son utilisation comme agent de contrôle de la prolifération d'*H. akashiwo*. En 2000, les résultats de Tarutani *et al.* ont suggéré que

² Ici le terme de biomasse désigne l'énergie provenant de la dégradation des matières organiques.

les virus peuvent jouer un rôle important dans la détermination de la composition clonale et le maintien de la diversité clonale des populations d'*H. akashiwo*. L'intérêt pour ce type d'application (contrôle biologique) n'est plus si fort aujourd'hui, les chercheurs étant confrontés à un problème bien plus complexe que celui attendu : les espèces phytoplanctoniques naturelles capables de proliférer sont composées de cellules plus ou moins résistantes ou sensibles à l'infection virale. D'après Nagasaki *et al.*, il faudrait s'intéresser aux effets d'un «cocktail» de clones à *H. akashiwo* avec différents degrés de spécificité d'infection. À cela s'ajoute la difficulté de rendre un tel contrôle biologique efficace dans des écosystèmes lacustres de grande taille. Il faudrait déverser des quantités surréalistes de particules infectieuses de manière homogène pour espérer un résultat probant. Avec des hélicoptères ? Quand ? Comment ? Avec quelles conséquences sur la structure et le fonctionnement de l'écosystème ? Bien des questions et pas forcément de réponses évidentes ou sensées !

Très récemment, Brussaard *et al.* ont montré, grâce notamment à la modélisation mathématique, que c'est l'action conjointe des virus et d'autres paramètres clefs (les nutriments, la lumière et les prédateurs) qui est responsable du contrôle et/ou du déclin d'une espèce phytoplanctonique envahissante de nombreuses eaux côtières, comme *Phaeocystis pouchetti* (Ruardij *et al.*, 2005).

Un autre exemple de l'importance écologique de virus de microalgues est celui d'*Emiliana huxleyi*, une algue microscopique unicellulaire eucaryote calcifiée. Cette algue abondante dans l'Atlantique nord peut former des efflorescences si grandes qu'elles peuvent être vues de l'espace. Cet organisme, comme d'autres algues, peut produire une substance appelée le diméthyl sulfure (DMS) lors de sa dégradation dans l'eau de mer, très largement causée par la lyse virale. Le DMS ainsi produit peut se répandre dans l'atmosphère et, après oxydation, être responsable d'une part non négligeable de l'effet de serre.

Une autre découverte considérable concernant les virus d'*Emiliana huxleyi* a été faite par des équipes britanniques (Wilson *et al.*). Ils ont découvert un virus constitué de 472 gènes, ce qui pour le moment constitue l'un des records (à titre de comparaison, le VIH ne possède que neuf gènes). Parmi ces gènes, ils ont découvert un ensemble de gènes responsables de la production de céramide ! Ce composant est un anti-ride et un anti-vieillessement utilisé dans les cosmétiques. Plus couramment rencontrée dans certaines cellules animales et végétales, la céramide peut contrôler le mécanisme de mort cellulaire programmée (appelé apoptose). Les virus auraient donc la faculté de contrôler le moment où leur hôte doit mourir, ou sa survie, ce qui est tout à fait incroyable.

Ainsi, ils se servent des cellules comme d'une usine pour se répliquer, ils en prennent le contrôle total et final avant de s'en débarrasser. Ce mécanisme permet d'entrevoir de nombreux développements pour maîtriser des maladies menaçant la survie de l'individu ou même le vieillissement.

Un autre exemple spectaculaire de détournement de la machinerie cellulaire de l'hôte concerne les cyanobactéries et leurs virus. Nous savons que les océans sont responsables de la moitié de la photosynthèse de notre planète et, dans les régions pauvres en nutriments, deux genres de cyanobactéries particulièrement, *Synechococcus* (Waterbury *et al.*, 1979) et *Prochlorococcus* (Chisohlm *et al.*, 1988), contribuent à ce processus pour 32 à 89 %. En 2003, Mann *et al.* ont découvert que les cyanophages infectant *Synechococcus* possèdent des gènes codants pour des composants clés de l'appareil photosynthétique ! Cette découverte a permis depuis de montrer que l'expression de ces protéines photosynthétiques codées par les gènes viraux permettrait aux cellules infectées de ne pas cesser leur activité de photosynthèse. Elles travaillent jusqu'au dernier moment. Ainsi peut-on dire qu'une proportion de l'oxygène que nous respirons est en réalité un sous-produit de l'infection virale ! En 2005, les génomes complets de plusieurs phages infectant des cyanobactéries marines ont été publiés, révélant différentes façons de «manipuler» la physiologie des cellules infectées. La machinerie virale est tout simplement stupéfiante.

Contrôle de la mortalité bactérienne

Aujourd'hui les laboratoires de microbiologie aquatique cherchent à comparer les pertes bactériennes liées à l'activité bactériophage des protistes phagotrophes avec celles liées à l'infection virale. Différentes études sur ce sujet – en milieu marin – ont fourni des résultats contrastés, en montrant que la lyse virale est capable de contrôler la production bactérienne à hauteur de 20, 50, voire 90 à 100 %. Toutes s'accordent pourtant pour affirmer que la lyse virale peut occasionnellement prévaloir sur la prédation des protistes dans la mortalité bactérienne.

Pour la compréhension de la dynamique virale et du rôle des phages dans les systèmes d'eaux douces, nos premiers résultats permettent de constater que les virus pouvaient être responsables jusqu'à 50 % de la mortalité bactérienne journalière en l'absence d'autres prédateurs (Lac du Bourget, mai 2003, par exemple). La part attribuable aux prédateurs « classiques » l'emportait généralement sur la lyse virale (10 % pour les virus contre 30 % pour les flagellés au mois de mai 2004 dans le lac Léman, par exemple). Dans l'avenir, nous approfondirons cette question du contrôle viral des communautés bactériennes et phytoplanctoniques – la base de la pyramide alimentaire lacustre – en comparant des écosystèmes caractérisés par des situations trophiques contrastées, comme le lac d'Annecy, de statut oligotrophe (pauvre en nutriments), et les lacs Léman et du Bourget dits mésotrophes (moyennement riches).

Contrôle direct de la diversité bactérienne : « *killing the winner* »

La diversité phénotypique et génotypique des populations de phages est directement liée à l'interaction entre les phages et leurs hôtes (Weinbauer, 2004). Sans hôte, pas de parasite. Sans hôte avec ses particularités biochimiques, pas de virus spécifiques. Les scientifiques se servent de cette propriété d'interaction pour étudier l'influence des bactériophages sur la diversité du bactérioplancton. D'après le concept formulé par Thingstad et Lignell, « *killing the winner* » (1997), les virus ordinairement tuent les microorganismes les plus compétitifs et peuvent donc garder le contrôle sur ces populations ou espèces dominantes. En effet, lorsqu'un groupe bactérien devient important numériquement, la probabilité de rencontrer son pathogène augmente, et par conséquent la lyse virale s'exerce à une intensité plus forte sur cette population. Ceci permet la co-existence de populations moins compétitives et minoritaires, tout en assurant le maintien de la diversité bactérienne.

Il a été montré que les phages se propagent en fonction de la densité en hôtes et peuvent alors changer la composition clonale de l'hôte, par le biais notamment de mécanismes liés à la résistance. (Middelboe *et al.*, 2001 ; Tarutani *et al.*, 2000 ; Jacquet *et al.*, 2002 ; Tomaru *et al.*, 2004). Dans les eaux douces, l'incubation d'un échantillon rempli de bactéries avec ou sans les virus du même milieu se traduit par des changements dans les abondances, les taux de croissance et la diversité bactérienne (Weinbauer et Hofle, 1998 ; Suttle, 1992 ; Peduzzi et Weinbauer, 1993).

Ce concept est donc largement accepté mais un effet indirect est également possible : un événement massif de lyse d'une communauté phytoplanctonique ou bactérienne se traduirait par une libération de matière organique dont la biodisponibilité profiterait à la communauté bactérienne ; sa structure pourrait alors être modifiée de manière notable (Van Hammen *et al.* 1999). Les changements de la composition de la matière organique dissoute sont connus pour induire des changements de la communauté bactérienne (Lebaron *et al.*, 1999 ; Riemann *et al.*, 2000 ; Arrieta et Herndl, 2002).

Contrôle indirect de la diversité bactérienne par le transfert horizontal³ de gènes

Les virus peuvent jouer un rôle central dans le transfert de gènes entre microorganismes, à travers deux processus : la transformation et la transduction.

Dans la transformation, le virus induit le transfert génétique de façon indirecte en provoquant la libération de l'ADN de la cellule hôte lysée, qui peut être récupéré et utilisé par un autre microorganisme.

Dans la transduction, plus directe et issue de la lysogénie, le virus incorpore une partie du matériel génétique de son hôte au sien puis l'injecte dans un autre hôte (Fuhrman, 2001). Ce phénomène est plus significatif pour les phages tempérés que lytiques mais il existe bien pour les deux.

Bien que l'étendue de ces mécanismes dans les systèmes aquatiques ne soit pas encore bien connue, ils peuvent toutefois avoir un rôle important dans le maintien de la diversité génétique des populations, à travers l'homogénéisation des gènes dans une population hôte donnée, mais également sur son évolution à plus grande échelle de temps (Ackermann, 2001).

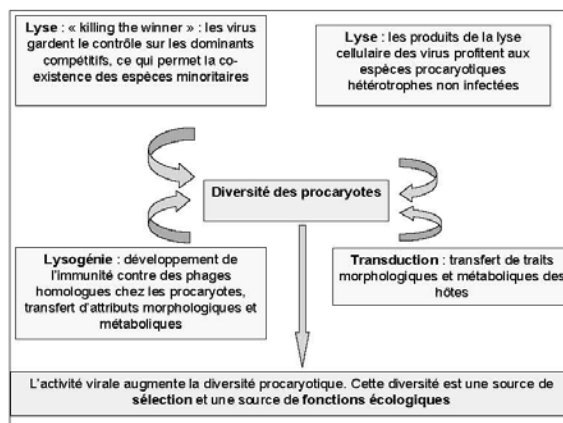


Figure 2. Effets potentiels des virus sur la diversité des procaryotes. D'après Weinbauer et Rassoulzadegan (2004).

En 1997, Chiura a ainsi démontré l'existence de transfert d'ADN entre un bactériophage marin et une bactérie non marine (entérobactérie de type *Escherichia coli*), ces transferts pouvant atteindre jusqu'à $3,6 \times 10^{-3}$ par particule virale. De la même façon, Jiang et Paul (1998) ont rapporté des fréquences de transduction supérieures à $1,3 \times 10^{14}$ événements par an dans l'estuaire de Tampa Bay (Floride). Plus récemment, Clokie *et al.* (2003) ont pu démontrer pour la première fois que les phages 12 infectant la souche marine *Synechococcus* pouvaient encapsider l'ADN de leur hôte (environ 8 % du génome complet) avec une fréquence totale de 10-4, fournissant de nouveau une évidence de l'importance potentielle des phages dans le transfert horizontal de gènes. Dans une revue bibliographique, Weinbauer et Rassoulzadegan (2004) soutiennent que l'activité virale participe à la variabilité

³ Dans le transfert horizontal, les gènes sont transférés d'un organisme mature, indépendant, à un autre. Ce transfert est différent du transfert génétique vertical où les gènes des parents sont directement transmis à leur descendance.

généétique des procaryotes, permettant ainsi leur fonctionnement écologique et leurs changements évolutifs. La figure 2 résume ces processus de diversification procaryotique *via* les virus.

Thérapie phagique contre infections bactériennes ?

L'émergence de bactéries pathogènes (à l'ère humain) résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles est un problème critique en médecine, davantage encore depuis que l'on observe une augmentation des patients immunodéprimés. Une des solutions pourrait être la thérapie par les bactériophages (Sulakvelidze *et al.* 2001). Son développement devra associer microbiologie médicale et microbiologie environnementale et c'est pourquoi nous en parlons ici.

La thérapie par les bactériophages consiste en la destruction des bactéries responsables d'une infection par leur(s) virus spécifique(s). Cette technique est inoffensive pour les organismes (êtres humains, animaux, plantes...) auxquels on injecte le virus, puisqu'un bactériophage est un virus ne pouvant infecter et « détruire » que les bactéries ciblées. Peu de temps après sa découverte des bactériophages, Félix d'Hérelle les utilisa pour lutter contre la dysenterie. Les études furent conduites à l'hôpital des enfants malades à Paris en 1919. Félix d'Hérelle, Victor Henry Hutinel (le chef de la pédiatrie de l'époque) et quelques internes s'inoculèrent le virus pour confirmer le caractère inoffensif du bactériophage sur l'être humain, puis l'utilisèrent pour traiter un enfant de douze ans. Les symptômes de dysenterie cessèrent après une seule administration et le garçon guérit quelques jours après. Le laboratoire de F. d'Hérelle produisit ensuite cinq phages contre des infections bactériennes ; l'Eli Lilly Company (Indianapolis, Ind) en produisit sept contre les infections à staphylocoque, streptocoque, *Escherichia coli* et d'autres pathogènes humains. Cependant, de nombreuses failles (comme la non-utilisation de placebo dans les études) permirent de contester les résultats. Ainsi, le Conseil de pharmacie et de chimie de l'Association médicale américaine demanda une revue complète de la littérature sur cette thérapie. En 1934, Monroe, Eaton et Stanhope Bayne-Jones, après avoir analysé plus de 100 publications, conclurent que ce que F. d'Hérelle avait isolé n'était pas un virus mais plutôt une enzyme. Ces conclusions étaient fausses mais néanmoins, avec l'arrivée des antibiotiques quelques années après, cette technique thérapeutique allait complètement disparaître en Europe de l'Ouest et aux États-Unis. Des études se poursuivirent en Union Soviétique et en Europe de l'Est, mais de nombreux travaux ne furent pas accessibles à la communauté internationale.

Depuis quelques années, avec l'émergence de l'écologie virale et la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques, des études témoignent d'un regain d'intérêt pour cette thérapie : « Les bactériophages ont de nombreuses caractéristiques les plaçant comme des agents thérapeutiques attractifs. Ils sont : i) hautement spécifiques et très efficaces dans la lyse des pathogènes bactériens cibles ; ii) sauf preuve contraire, inoffensifs pour les organismes que l'on souhaite traiter ; iii) rapidement modifiables pour combattre l'émergence des nouvelles menaces bactériennes. De plus, un large nombre de publications suggèrent que les bactériophages sont des agents thérapeutiques efficaces en sélectionnant les paramètres cliniques. Malheureusement la plupart de ces publications ne remplissent pas les standards rigoureux actuels de l'expérimentation clinique et ils restent encore de nombreuses questions auxquelles il faut répondre avant de pouvoir utiliser les bactériophages en thérapie. Cependant nous pensons que le nombre de données et le besoin désespéré de trouver des traitements alternatifs contre la rapide émergence de la résistance des bactéries aux antibiotiques justifient de continuer et développer les études sur cette thérapie. » (A. Saib, commun. pers.)

Il reste donc encore de nombreuses questions auxquelles il faut répondre avant de pouvoir l'utiliser, comme la lysogénie, la transduction, la spécificité des virus pour leur(s) bactérie(s), la diversité virale, réponses qui pourront être apportées par l'écologie virale, notamment aquatique !

Encadré 3 : Le contrôle viral du réchauffement climatique

L'élévation rapide de la température de notre planète est liée à l'augmentation des gaz à effet de serre d'origine anthropique, c'est-à-dire liée aux diverses activités humaines. Dans l'atmosphère, ces gaz piègent les rayonnements solaires et engendrent l'élévation de la température. Le dioxyde de carbone (CO_2) est le principal gaz à effet de serre. Une des possibilités majeures de faire disparaître l'excédent de CO_2 relargué par les activités humaines se situe dans les écosystèmes aquatiques. En effet, dans les océans, le CO_2 est utilisé par la pompe biologique, pour être transformé en molécule organique et stocké dans les fonds sous-marins. On appelle pompe biologique l'ensemble des organismes impliqués dans le transfert du CO_2 dans les sédiments. Tout commence par les organismes photosynthétiques (le phytoplancton) qui se servent du CO_2 comme source de carbone pour synthétiser leurs composants essentiels : les molécules organiques. Ces organismes sont alors consommés par des prédateurs incapables de synthétiser leur propre matière organique à partir de molécules minérales. Ces prédateurs sont, à leur tour, consommés par des prédateurs supérieurs et ainsi de suite... Il s'établit donc un réseau trophique, en fait plusieurs. Ces successions de relation prédateur/proie associées à la mortalité naturelle des organismes génèrent une grande quantité de matière organique libre dans l'océan. Cette matière libre est désignée par le terme de matière organique dissoute, quand sa taille est inférieure à $0,2 \mu\text{m}$, et de matière organique particulaire, quand sa taille est supérieure à $0,2 \mu\text{m}$. Par gravité, la matière particulaire se dirige vers les sédiments où elle est stockée. L'autre grande fraction de la matière organique, la matière dissoute est, quant à elle, utilisée par les bactéries hétérotrophes de la colonne d'eau. Ces bactéries utilisent cette matière organique dissoute comme principale source de carbone, c'est-à-dire qu'elles vont reminéraliser cette matière par leur activité respiratoire, et donc réémettre du CO_2 dans l'atmosphère. Contrairement à tous les autres organismes de la pompe biologique, les bactéries représentent un compartiment favorisant le relargage de gaz à effet de serre. Il paraît donc évident que les organismes consommateurs de ces bactéries, comme les protistes hétérotrophes, permettent la ré-injection de la matière organique dans le réseau trophique classique (nutriments-phytoplancton-zooplancton-poissons). Les virus contribuent également à limiter le retour du CO_2 dans l'atmosphère, grâce notamment à leur activité lytique (destruction des cellules) sur les communautés de la pompe biologique. Cette activité permet, en effet, d'inhiber partiellement la respiration cellulaire et, par conséquent, elle met fin à la minéralisation de la matière organique en CO_2 . Les communautés virales interviennent donc directement dans la régulation de la quantité de gaz à effet de serre. Cependant le rôle amplificateur ou inhibiteur des virus dans le piégeage des gaz à effet de serre est encore à l'étude. Car, s'il apparaît clairement que le rôle destructeur des virus sur certaines bactéries contribue à diminuer le relargage du CO_2 dans l'atmosphère, ces mêmes virus peuvent au contraire favoriser le développement d'autres bactéries en leur fournissant quantité de matière organique dissoute issue de la lyse de leurs sœurs. Un autre exemple d'effet potentiel indésirable des virus est celui lié à la production du gaz DMS, le diméthyl sulfure. Ce gaz constitue une fraction importante du sulfure atmosphérique d'origine océanique. Les produits de l'oxydation de ce gaz dans l'atmosphère constituent la source majeure des aérosols qui influencent le climat global en diffractant et en absorbant les radiations solaires. Le précurseur majeur du DMS est le diméthylsulfoniopropionate (DMSP), présent dans les organismes phytoplanctoniques (par exemple *Emiliana huxleyi* ou *Phaeocystis pouchetii*). Ces microalgues forment des efflorescences sensibles à la lyse virale et il a été montré que les virus de ces microalgues jouent, potentiellement, un rôle clé dans la libération du DMS dans l'atmosphère (Bratbak *et al.*, 1995 ; Malin *et al.*, 1998).

Actuellement les scientifiques tentent de prévoir dans quelle mesure les océans pourraient compenser les relargages croissant de CO_2 d'origine anthropique. Pour ce faire, une compréhension précise des flux de carbone au sein de la pompe biologique est nécessaire. Elle ne peut avoir lieu sans une étude approfondie du réseau trophique classique, de la boucle microbienne et de l'impact des virus sur les communautés qui la caractérisent.

Citons la furunculose causée par la bactérie *Aeromonas salmonicida*, l'une des principales causes de mortalité chez les salmonidés d'élevage. L'antibiothérapie constitue l'approche thérapeutique la plus répandue. Imbeault et son équipe ont exploré la possibilité d'utiliser des bactériophages comme moyen de prévention pour contrôler les populations de *A. salmonicida*. La sensibilité de 23 souches de *A. salmonicida*, résistantes à aucun, un, deux ou trois antibiotiques, a été évaluée vis-à-vis de 12 bactériophages. Les résultats ont montré que les souches de *A. salmonicida* résistantes aux antibiotiques utilisés dans l'industrie piscicole canadienne sont aussi sensibles à de nombreux bactériophages que les souches sensibles aux antibiotiques. De même, toutes les souches de *A. salmonicida* étudiées sont sensibles à plusieurs bactériophages et, inversement, plusieurs bactériophages sont efficaces contre toutes les souches bactériennes de *A. salmonicida* utilisées. Il est donc possible d'envisager un traitement préventif à base de bactériophages pour lutter contre la furunculose chez les salmonidés d'élevage.

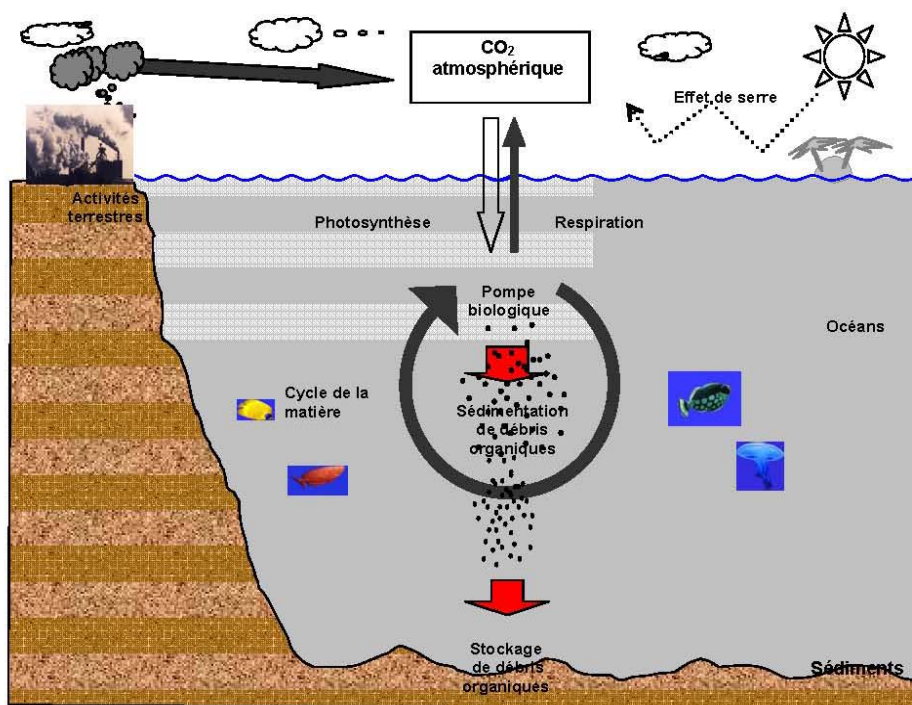


Figure 3. Le contrôle viral du réchauffement climatique (d'après S. Personnic).

L'écologie virale aquatique a le vent en poupe

Les virus sont aujourd'hui reconnus comme un compartiment clé des systèmes microbiens aquatiques. Un de leurs rôles majeurs concerne la mortalité des bactéries auto- et hétérotrophes. De ce processus découle un accroissement de la matière organique disponible pour le compartiment bactérien. En définitive, c'est la totalité du système qui profite de cette stimulation puisque ces processus permettent la redistribution de la nourriture dans la zone euphotique et au-delà. Enfin, nous avons vu que les virus ont une influence importante sur la composition spécifique et les transferts génétiques bactériens. Ainsi, les virus jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement et le maintien de la vie (aquatique et terrestre). Toutes ces découvertes remettent en cause certains résultats obtenus en microbiologie aquatique alors que le compartiment viral n'était pas pris en compte.

Douze équipes sur le territoire national et une équipe à Dakar (Sénégal) appartiennent au réseau Ravage (Réseau français de virologie aquatique en génomique et écologie), créé et animé par Stéphane Jacquet. Deux colloques ont eu lieu fin 2005 et début 2007 afin de promouvoir et structurer ce champ de la recherche en France. Un site web est désormais disponible : <http://virusecologie.free.fr/index.htm>.

Nous espérons que de nombreux autres microbiologistes s'intéresseront à ce compartiment biologique. L'histoire des sciences écologiques de chaque communauté suit un modèle récurrent : découverte de la communauté, développement de techniques d'études, puis acquisition de données sur la dynamique, le

rôle fonctionnel et la diversité. L'écologie bactérienne en est déjà au stade de la connaissance de la diversité bactérienne par les méthodes de la biologie moléculaire.

Aujourd'hui, les laboratoires de microbiologie environnementale s'équipent pour étudier cette diversité bactérienne. N'assisterons-nous pas demain à un transfert de ces recherches sur la diversité virale ? Nous parions que oui, sachant que : la diversité virale (en termes de type/espèce) est sûrement bien plus élevée que la diversité bactérienne ; la dynamique de cette diversité influence la structure et le fonctionnement de la boucle microbienne à la base des réseaux trophiques ; la modélisation des flux de matière dans la biosphère passe par la connaissance de l'ensemble des communautés biologiques, surtout lorsque celles-ci peuvent intervenir directement ou indirectement dans des changements à l'échelle planétaire (encadré 3 et figure 3). Rendez-vous donc dans 10 ans dans un prochain numéro du *Courrier de l'Environnement de l'INRA* ! ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Hélène Montanier et Jean-Christophe Auguet (université de La Rochelle), Thierry Bouvier (université de Montpellier II), Markus Weinbauer (Laboratoire océanologique de Villefranche-sur-Mer) et Ursula Dorigo (équipe de microbiologie à Thonon) pour leur lecture critique et les corrections apportées sur une version antérieure du manuscrit.

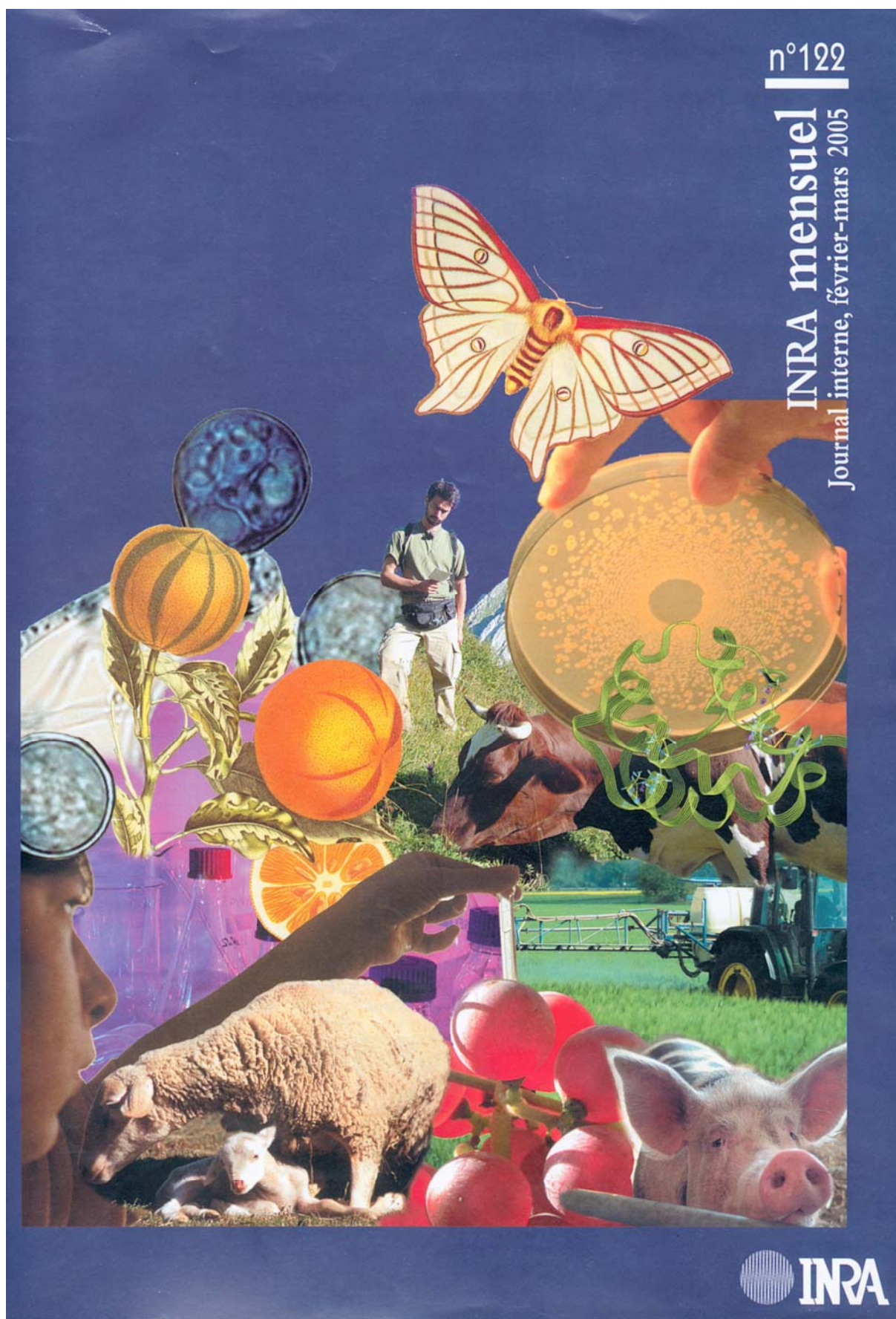
Références bibliographiques

- ACKERMANN H.W., 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146, 843-857.
- ACKERMANN H.W., 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154, 245-251.
- ACKERMANN H.W., DUBOW M.S., 1987. Viruses of prokaryotes, vol I, general properties of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, 13-47.
- ARRIETA J. M., HERNDL G. J., 2002. Changes in bacterial beta-glucosidase diversity during a coastal phytoplankton bloom. *Limnology and Oceanography*, 47, 594-599.
- AZAM F.T., FENCHEL J.G., FIELD J.S., GRAY L. A., MEYER R., THINGSTAD F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257-263.
- BERGH Ø., BØRSHEIM K. Y., BRATBAK G., HELDAL M., 1989. High abundances of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340, 467-468.
- BETTAREL Y., SIME-NGANDO T., AMBLARD C., LAVERAN H., 2000. A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2283-2289.
- BETTAREL Y., SIME-NGANDO T., AMBLARD C., DOLAN J., 2004. Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2941-2951.
- BETTAREL Y., BOUVY M., DUMONT C., SIGME-NGANDO T., GESSNER M.O., 2006. Virus-bacterium interactions in water and sediment of west African inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5274-5282.
- BRATBAK G., HELDAL M., NORLAND S., THINGSTAD T. F., 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1400-1405.
- BRATBAK G.F., THINGSTAD T.F., HEDAL M., 1994. Viruses and microbial loop. *Microbial Ecology*, 28, 209-221.
- BRATBAK G., LEVASSEUR M., MICHAUD S., CANTIN G., FERNANDEZ E., HEIMDAL B. R., HELDAL M., 1995. Viral activity in relation to *Emiliana huxleyi* blooms: a mechanism of DSMP release ? *Marine Ecology Progress Series*, 128, 133-142.
- BREITBART M.P., SALOMON B., ANDRESEN J. M., MAHAFFY A. M., SEGALL D., MEAD F., AZAM F.T., ROHWER R., 2002. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 14250-14255.
- BRUSSAARD C.P.D., 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1506-1513.
- BRUSSAARD C. P. D., KUIPERS B., VELDHUIS M.J.W., 2005. A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics. I. Regulatory role of viruses in bloom dynamics. *Harmful Algae* 4:859-874.
- CHISOHLM S.W., OLSON R. J., ZETTLER E. R., GOERICKER R., WATERBURY J. B., 1988. A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 340-343.
- CHIURA H.X., 1997. Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 75-83. CLOKIE M.R.J., MILLARD A.D., WILSON W.H., MANN N.H., 2003. Encapsidation of host DNA by bacteriophages infecting marine *Synechococcus* strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, 349-352.
- DANOVARO R., DELL'ANNO A., PUSCEDDU M., FABIANO M., 1999. Nucleic acid concentrations (DNA, RNA) in the continental and deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean: relationships with seasonally varying organic

- inputs and bacterial dynamics. *Deep-Sea Research*, 46, 1077-1094.
- DANOVARO R., DELL'ANNO A., TRUCCO A., SERRESI M., VANUCCI S., 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1384-1387.
- DRAKE L. A., CHOI K.H., EDWARD HASKELL A. G., DOBBS F. C., 1998. Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquatic Microbial Ecology*, 16, 17-25.
- DUHAMEL S., JACQUET S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 64(3), 316-332.
- EDWARDS R. A., ROHWER F., 2005. Viral metagenomics. *Nature Reviews in Microbiology*, 3(6), 504-510.
- FERRIS M. M., STOFFEL C. L., MAURER T. T., ROWLEN K. L., 2002. Quantitative intercomparison of transmission electron microscopy, flow cytometry, and epifluorescence microscopy for nanometric particle analysis. *Analytical Biochemistry*, 304, 249-256.
- FILIPPINI M., BUESING N., BETTAREL Y., SIME-NGANDO T., GESSNER M.O., 2006. Infection paradox : high abundance but low impact of freshwater benthic viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 : 4893-4898.
- FUHRMAN J.A., SUTTLE C.A., 1993. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, 6, 51-63.
- FUHRMAN J. A., NOBLE R. T., 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, 42, 1236-1242.
- FUHRMAN J.A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399, 541-548.
- FUHRMAN J.A., 2001. Plankton viruses. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing group. London.
- GLUD R. N., MIDDELBOE M., 2004. Virus and bacteria dynamics of a coastal sediment: implication for benthic carbon cycling. *Limnology and Oceanography*, 49, 2073-2081.
- GOBLER C.J., HUTCHINS D.A., FISHER N.S., COSPER E.M., SANUDO-WILHELMY S.A., 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnology and Oceanography*, 42, 1492-1504.
- HELDAL M., BRATBAK G., 1991. Production and decay of viruses in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series*, 72, 205-212.
- HENNES K.P., SIMON M., 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 333-340.
- JACQUET S., HELDAL M., IGLESIAS-RODRIGUEZ D., LARSEN A., WILSON W., BRATBAK G., 2002. Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyi* bloom terminated by viral infection. *Aquatic Microbial Ecology*, 27, 111-124.
- JACQUET S., DOMAISON I., PERSONNIC S., DUHAMEL S., PRADEEP RAM A.S., HELDAL M., SIME-NGANDO T., 2005. Estimates of viral lysis vs. protozoan predation of bacteria of Lake Bourget, France. *Freshwater Biology*, 50, 627-645.
- JIANG S.C., PAUL J.H., 1998. Gene transfert by transduction in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2780-2787.
- LEBARON P., SERVAIS P., TROUSSELIER M., COURTES C., VIVES-REGO J., MUYZER G., BERNARD L., GUINDULAIN T., SCHAFER H., STACKEBRANDT E., 1999. Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 255-267.
- MALIN G., WILSON W. H., BRATBAK G., LISS P. S., MANN N. H., 1998. Elevated production of dimethylsulfide from viral infection of cultures of *Phaeocystis pouchetii*. *Limnology and Oceanography*, 43, 1389-1393.
- MANN N. H., 2003. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiology Review*, 27, 17-34.
- MANN N. H., COOK A., MILLARD A., BAILEY S., CLOKIE M., 2003. Bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature* 424:741.
- MARANGER R., BIRD D.F., 1996. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Québec. *Microbial Ecology*, 31, 141-151.
- MARIE D., BRUSSAARD C.P.D., THYRHAUG R., BRATBAK G., VAULOT D., 1999. Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 45-52.
- MATHIAS C.B., KIRSCHNER A.K.T., VELIMIROV B., 1995. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube river. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3734-3740.
- MEI M.L., DANOVARO R., 2004. Virus production and life strategies in aquatic sediments. *Limnology and Oceanography*, 49:459-470.
- MIDDELBOE M., HAGSTRÖM A., BLACKBURN N., SINN B., FISCHER U., BORCH N., PINHASSI J., SIMU K., LORENZ M.G., 2001. Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microbial Ecology*, 42, 395-406.
- MIDDELBOE M., GLUD R. N., 2003. Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnology and Oceanography*, 48, 1447-1456.
- NAGAZAKI K., TARUTANI K., YAMAGUCHI M., 1999. Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 898-902.
- NOBLE R. T., FUHRMAN J. A., 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14(2), 113-118.
- NOBLE R.T., MIDDELBOE T.M., FUHRMAN J.A., 1999. Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 18, 1-13.
- PADAN E., SHILO M., 1973. Cyanophages-Viruses attacking blue green algae. *Bacteriological Reviews*, 37(33), 343-370.
- PAUL J.H., JIANG S.C., ROSE J.B., 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2197-2204.

- PAUL J.H., ROSE J.B., JIANG S.C., KELLOGG C.A., DICKSON L., 1993. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 718-724.
- PAUL J.H., SULLIVAN M.B., SEGALL A.M., ROHWER F., 2002. Marine phage genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 133, 463-476.
- PEDUZZI P., WEINBAUER M. G., 1993. The submicron size fraction of seawater containing high numbers of virus particles as bioactive agent in unicellular plankton community successions. *Journal of Plankton Research*, 15, 1375-1386.
- PERSONNIC S., DORIGO U., DOMAIZON I., JACQUET S., 2004. Seasonal and spatial variability of viro-, bacterio- and picophytoplankton in three peri-alpine lakes. *Freshwater Biology* (soumis).
- RAOULT D., AUDIC S., ROBERT C., ABERGEL C., RENESTO P., OGATA H., LA SCOLA B., SUZAN M., CLAVERIE J.M., 2004. The 1.2-Megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, 306, 1344-1350.
- REGENMORTEL M.H.V.V., 1992. Concept of virus species. *Biodiversity and conservation*, 1, 263-266.
- RIEMANN L., STEWARD G. F., AZAM F., 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 578-587.
- RUARDIJ P., VELDHIJS M. J. W., BRUSSAARD C. P. D., 2005. Modeling the bloom dynamics of the polymorphic phytoplankton *Phaeocystis globosa*: impact of grazers and viruses. *Harmful Algae*, 4, 941-963.
- SIME-NGANDO T., 1997. Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. *Année Biologique*, 36(3), 181-206.
- SIME-NGANDO T., BETTAREL Y., CHARTOGNE C., SEAN K., 2003. The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Research Development in Microbiology*, 7, 481-497.
- SPENCER R., 1955. A marine bacteriophage. *Nature*, 175, 690-691.
- SULAKVELIDZE A., ALAVIDZE Z., MORRIS J.G., 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-659.
- SUTTLE C. A., 1992. Inhibition of photosynthesis in phytoplankton by the submicron size fraction concentrated from seawater. *Marine Ecology Progress Series*, 87, 105-112.
- SUTTLE C. A., 2000. Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. In C. Hurst (ed): *Viral ecology*. Academic Press, San Diego, 247-296.
- SUTTLE C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437 : 356-361.
- TARUTANI K., NAGAZAKI K., YAMAGUCHI M., 2000. Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 898-902.
- THINGSTAD T.F., LIGNELL R., 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 19-27.
- THYRHAUG R., LARSEN A., THINGSTAD T.F., BRATBAK G., 2003. Stable coexistence in marine algal host-virus systems. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 27-35.
- TOMARU Y., TARUTANI K., YAMAGUCHI M., NAGASAKI K., 2004. Quantitative and qualitative impacts of viral infection on a *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Aquatic Microbial Ecology*, 34, 227-238.
- TORELLA F., MORITA R., 1979. Evidence by electron micrographs for a incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 774-778.
- VAN HANSEN E. J., ZWART G., VAN AGTERVELD M.P., GONS H.J., EBERT J., LAANBROEK H.J., 1999. Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 795-801.
- VENTER J. C., REMINGTON K., HEIDELBERG J.F., HALPERN A.L., RUSCH D., EISEN J.A., WU D., PAULSEN I. et al. (23 authors), 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66-74.
- VREDE K., STENSDOTTER U., LINDSTRÖM E.S., 2003. Viral and Bacterioplankton Dynamics in Two Lakes with Different Humic Contents. *Microbial Ecology*, 46(4), 406-415.
- WATERBURY J.B., WATSON, S.W., GUILLARD R.R.L., BRAND L.E., 1979. Widespread occurrence of a unicellular marine planktonic cyanobacterium. *Nature*, 277, 293-294.
- WILSON W. H., SCHROEDER D.C., ALLEN M.J., HOLDEN M.T., PARKHILL J., BARELL B.G., CHURCHER C. et al. (16 authors), 2005. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a coccolithovirus. *Science* 309:1090-1092.
- WEINBAUER M. G., HOFLE M.G., 1998. Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3776-3783.
- WEINBAUER M. G., BRETTAR I., HOFLE M.G., 2003. Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnology and Oceanography*, 48, 1457-1465.
- WEINBAUER M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 127-181.
- WEINBAUER M.G., RASSOULZADEGAN F., 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6, 1-11.
- WILHELM S. W., SUTTLE C.A., 1999. Viruses and Nutrient Cycles in the Sea - Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*, 49(10), 781-788. WILHELM S.W., SUTTLE C.A., 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Biosciences*, 49, 781-788.
- WILHELM S. W., BRIGDEN S. M., SUTTLE C. A., 2002. A dilution technique for the direct measurement of viral production: A comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microbial Ecology*, 43 (1), 168-173.
- WOMMACK K.E., COLWELL R.R., 2000. Virioplankton : viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 69-114.

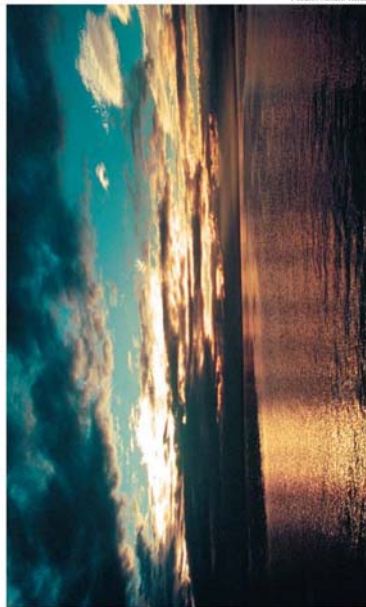
- ANNEXE III -



Actualités scientifiques

Importance des virus en milieu lacustre

L'écologie virale aquatique est une science relativement jeune, 15 ans, et jusqu'à très récemment, l'impact des virus n'était pas pris en compte dans la régulation des peuplements microbiens¹ pour laquelle seule la disponibilité des ressources nutritives et les processus d'origine biotique, comme la prédation et la compétition, étaient considérés comme prépondérants.



Les Lémans.

Cette thématique de recherche est un des vides auquel s'intéresse désormais l'équipe de Microbiologie aquatique de Thonon-les-Bains. Depuis 2 ans, les communautés microbiennes (virus, bactéries auto- et hétérotrophes², protozoaires) à la base du réseau trophique pelagique sont étudiées dans les lacs Léman d'Aiguey et du Bourget par microscopie et cytofluorimétrie. Ces différents micro-organismes caractérisent ce que l'on appelle la boucle microbienne et ont chacun un ou plusieurs rôles-clés : les virus interviennent dans la mortalité et la diversité des bactéries, ces dernières étant les principaux acteurs dans la reminéralisation de la matière organique et source de nourriture pour les prédateurs³. Des expériences "in situ" ont d'ores et déjà permis d'estimer la mortalité des bactéries engendrée par l'action des virus (type viralité) dans les eaux de surface du lac Léman et du Bourget et elle est loin d'être négligeable !

L'omniprésence et le rôle-clé des processus microbiens dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques font de leur étude une nécessité. L'importance qualitative, quantitative et fonctionnelle des virus bactériophages⁴ et leur impact dans le contrôle et le déclin des communautés bactériennes dans les écosystèmes

systèmes lacustres sont encore mal connus. On sait aujourd'hui que les virus interviennent dans les processus de perte (mortalité) qui affectent les communautés microbiennes, mais aussi dans la structure en taille, la composition et la régulation de la diversité des peuplements microbiens, et enfin dans le recyclage des nutriments.

Les virus sont des agents infectieux (parasites obligatoires) dont l'organisation structurale est simple et acellulaire. Ils possèdent un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), simple ou double brin et ils ne peuvent se multiplier indépendamment des cellules vivantes qu'ils infectent, appelées hôtes. Bien qu'ils constituent les plus petites entités biologiques connues à ce jour, avec une taille variant entre 20 et 260 nanomètres (majorité < 60 nm), de diamètre, les virus sont les entités biologiques les plus abondantes (> 10 milliards par millilitre) et sûrement les plus diverses des écosystèmes aquatiques. On sait aujourd'hui que les bactéries et les Archéobactéries sont les cellules les plus abondantes dans l'eau de mer, et il est admis que la majeure partie de la communauté virale est composée de bactériophages. Toutefois, le rôle fonctionnel, la dynamique et la diversité des virus dans les écosystèmes

aquatiques en particulier, demeurent⁵ français n'ont fait l'objet que d'un nombre très limité d'études.

La lyse virale dans les lacs Léman et du Bourget.
Les lacs Léman et du Bourget sont les plus grands écosystèmes lacustres naturels en France et même en Europe occidentale. Ils constituent un patrimoine écologique de tout premier plan et une haute valeur ajoutée en termes de ressources touristiques et professionnelles. Le suivi de la qualité de leurs eaux passe notamment par une meilleure connaissance de l'ensemble des "compartiments biologiques" (des microbes jusqu'aux poissons) qui les caractérisent et de leurs interactions.

L'un des buts de nos travaux est d'étudier l'importance écologique des bactériophages. Une des raisons à cela est que les lacs Léman et du Bourget sont en voie de restauration : ce qui sous-entend qu'à moyen-long terme, les communautés microbiennes deviendront de plus en plus prépondérantes⁶. Ainsi rétrospectivement le suivi de l'abondance des différents groupes biologiques que sont les virus, les bactéries, les protozoaires phytoplanctoniques et les protozoaires flagellés et/ou ciliés à environ 15 jours d'intervalle sur ces lacs. Parallèlement à ce suivi, des expériences ont déjà été réalisées afin de déterminer la part de mortalité bactérienne attribuable à la lyse virale comparativement à celle due à la prédation par les protozoaires flagellés et/ou ciliés, c'est-à-dire les principaux prédateurs connus des bactéries. Enfin, la diversité des bactéries et des virus a été suivie par des expérimentations de biologie moléculaire.

Les premiers résultats ont permis de constater que les virus pouvaient être responsables jusqu'à 50% de la mortalité bactérienne journalière en l'absence d'autres prédateurs (lac du Bourget, mai 2003, par exemple). Généralement, il a été constaté que la part attribuable aux prédateurs "classiques" (l'emportail sur la lyse virale : 10% pour les virus contre 30% pour les flagellés au mois de mai 2004 dans le lac Léman, par exemple). Que le pourcentage de mortalité bactérienne lié à la lyse virale soit élevé ou relativement faible, il est loin d'être négligeable et il est fort probable qu'il varie considérablement sur des échelles de temps relativement courtes, de l'ordre de la journée. De plus, il est important de noter que la lyse virale de certaines bactéries va provoquer la libération d'éléments nutritifs qui serviront à d'autres bactéries. On comprend dès lors mieux combien ce processus peut être important dans la structuration (modification de la diversité) des communautés bactériennes. L'étude de l'impact de ces virus sur la diversité bactérienne est justement en cours d'analyse.

Quelques conclusions et perspectives

À ce jour et compte tenu du caractère préliminaire de nos travaux, il n'est pas encore possible de tirer de

conclusions définitives sur l'importance relative des virus dans les lacs Léman et du Bourget. Néanmoins, il est possible d'affirmer l'importance quantitative des virus dans ces lacs (typiquement de l'ordre de 10¹⁰ - 10¹¹ virus/ml) et leur rôle qui semble loin d'être négligeable en terme de mortalité bactérienne.

Un volet important de nos travaux devra s'intéresser à l'impact des virus sur la régulation de la diversité bactérienne et à la diversité virale elle-même. Une étude récente de notre équipe a révélé l'importante diversité de certains virus dans le lac du Bourget⁷.

Dans l'avenir, d'autres expériences seront menées sur ces lacs à différentes périodes de l'année et à différentes profondeurs de "la colonne d'eau" (correspondant à des strates physico-chimiques bien définies de la surface jusqu'au fond) afin d'accéder à la variabilité spatiale et temporelle de la lyse virale. Les lacs Léman et du Bourget étant mésotrophes⁸, il sera aussi intéressant de mener une étude de comparaison avec le lac d'Aiguey, oligotrophe⁹, où il est connu que le fonctionnement de la boucle microbienne est particulièrement efficace. Ces travaux d'écologie microbienne devraient aussi nous permettre de déterminer s'il existe un lien entre l'importance quantitative et fonctionnelle des virus et le statut trophique (oligotrophe ou mésotrophe) de ces écosystèmes.

Shahin Farsiani (Iran), Sébastien Joquet*
Microbiologie aquatique, Thonon-les-Bains
contact : joquet@THONON.ch
collaborateurs : Isabelle Domatiz (Ile de la Réunion),
Thierry Sime-Ngando (Ile de la Réunion),
Bernard Dumas (Ile de la Réunion)



Photographie en microscopie électronique à transmission montrant un cluster* de particules bactériennes et virales prélevées dans le lac du Bourget.
*Cluster : aggrégat de cellules et/ou particules.

⁵ D'origine locale, méditerranéenne d'une part, et

⁶ La situation des grands lacs répond à des programmes de dépollution du lac et de son bassin versant visant à améliorer la qualité des eaux et à les ramener vers un état oligotrophe. Il est attendu que ces modifications ont inévitablement des conséquences et un fonctionnement de la boucle microbienne en particulier.

⁷ Domatiz, Joquet, Farsiani, Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 1017-1023.

⁸ Mésotrophe : se dit d'un milieu moyennement riche en nutriments (typiquement à plusieurs) et médium végétal phytoplanctonique caractérisé par un milieu oligotrophe plus pauvre.

- ANNEXE IV -

Tableau A : Résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale des matrices « A » pour les données issus de l'épilimnion des trois lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Axes Canonique									
Lac Léman			Lac du Bourget			Lac d'Annecy			
I	II		I	II		I	II		
Valeurs propres canoniques									
	2,820	0,584		3,06646	1,05355		0,58143	0,44989	
% de la variance des 2 premiers axes de l'ACP									
	72,5001	15,005		55,0939	18,9288		30,528	23,6214	
% cumulatif de la variance des 2 premiers axes de l'ACP									
	72,5001	87,5049		55,0939	74,0227		30,528	54,1494	
Vecteurs propres normalisés									
Bact.	0,29918	0,02794	Bact.	0,20935	-0,01849	Bact.	-0,14836	0,06661	
Cyanob.	0,03613	-0,99919	Cyanob.	0,17321	-0,98331	Cyanob.	0,38513	0,92285	
Euc.	0,95351	0,0291	Eucar.	0,96238	0,181	Eucar.	-0,91086	0,37935	
Position des dates (Mois)									
Fe	-2,80822	0,58552	Fe	-2,28168	-0,40302	Fe	1,29182	-0,12487	
Ma	-1,5087	1,49084	Ma	-1,13222	2,17947	Ma	0,31819	0,18058	
Av	-0,42079	-0,38639	Av	-0,06707	-1,42184	Av	0,44337	-0,43177	
Mai	-0,43901	-0,40422	Mai	1,06611	-0,0078	Av	0,50397	0,10775	
Mai	-0,96911	-0,78681	Jl	1,69016	-0,31663	Mai	0,62942	-0,29033	
Jn	0,45832	0,09518	Jl	0,01414	-0,26614	Mai	-0,58891	0,48397	
Jl	1,49863	2,0644	Ao	1,09042	2,18979	Jn	-0,23942	-0,53298	
Jl	1,13336	0,86262	Se	1,73437	-0,01449	Jn	-0,56664	-0,27684	
Ao	2,48207	-0,10956	Se	0,79386	-0,09257	Jl	-1,60164	-0,21253	
Se	2,06228	1,91411	No	0,07928	-0,33532	Ao	-1,46377	-0,04151	
Oc	0,36087	-0,81152	No	-0,2857	-1,08215	Se	-0,37586	0,64188	
De	-1,11878	-0,37897	De	-1,0165	-0,65406	No	-0,25836	1,08015	
Ja	-1,19149	-0,47411	Ja	-1,98147	-1,16836	De	-0,5704	0,3916	
Ma	-1,83439	0,71631	Fe	-2,86072	-0,18084	Fe	1,19293	-0,13141	
Av	-1,01651	0,00643	Ma	-3,49256	-1,51593	Ma	-0,08316	-1,21528	
Av	-0,99823	0,08221	Av	-1,49958	-0,22241	Av	-0,20777	-0,24664	
Mai	-0,31485	0,08666	Mai	1,11647	-0,38912	Av	-0,79596	-0,74735	
Jn	1,06443	0,94181	Jn	0,32745	-0,7754	Mai	0,53992	0,45956	
Jl	2,20227	-0,30403	Jl	1,88633	0,54974	Mai	0,07908	0,36028	
Jl	1,59158	0,59961	Ao	-0,08281	1,83104	Jn	0,05136	0,30471	
Ao	-1,10208	-0,34397	Se	1,57162	0,07791	Jl	-0,84811	-0,00709	
Se	1,45932	-0,46457	Oc	2,77745	-0,12481	Se	-0,15041	0,61804	
Oc	0,43477	-0,26387	Oc	1,332	-0,18619	Oc	-0,32454	-1,01254	
Oc	-0,57505	0,25893	De	-0,27795	-0,0763	No	-0,7203	-1,65498	
De	-1,5887	-0,04275	De	-1,15058	-1,14323	De	0,7421	0,35778	
Ja	-2,42086	-0,32352	Ja	-0,87186	0,89741	Ja	1,2326	-0,4769	
Ma	-3,33695	-0,26888	Fe	-2,75302	-0,52853	Fe	1,0154	0,03004	
Ma	-2,10658	0,18317	Ma	-3,03833	0,92143	Ma	0,6602	-0,30222	
Av	-0,64071	-0,80648	Av	-2,46667	3,40121	Av	0,72912	-0,22582	
Mai	1,18473	-0,89823	Av	-1,39644	-0,68643	Av	1,17029	-0,31349	
Ju	2,20307	-0,62033	Mai	0,67521	0,27058	Mai	-0,00425	-0,19166	
Jl	0,95417	-0,88406	Mai	0,51079	-0,34534	Mai	0,19928	0,50123	

Se	3,42153	-0,72811	Jl	1,04456	-0,02536	Jn	-0,87939	-1,36039
Se	1,87961	-0,58743	Jl	2,63366	0,39333	Jn	-0,47585	0,60248
			Ao	1,21199	0,10712	Ju	-0,57024	1,35625
			Se	2,16017	-0,22105	Ju	-1,08848	0,85593
			Oc	2,93914	-0,63568	Se	-0,06474	1,23465
						No	1,07915	0,22972

Positions des variables explicatives

VLP1	-0,09957	-0,12953	VLP1	-0,09054	0,07882	VLP1	0,27851	0,06596
VLP2	0,3913	-0,06444	VLP2	0,33226	-0,08884	VLP2	-0,3733	0,12823
VLP3	0,26337	0,03662	VLP3	-0,2966	0,06123	VLP3	0,14151	0,15327
VLP4	0,4148	0,08035	VLP4	0,22613	0,06074	VLP4	0,08959	0,04319
Flagel.	0,69734	-0,0512	Flagel.	0,51133	-0,10167	Temp.	-0,15755	-0,17068
Cil.	0,34505	-0,09297	Cil.	0,26532	0,1098	Chl. A	-0,15595	0,01508
Temp.	0,53528	0,15826	Temp.	0,30635	-0,06561	NH4	-0,06792	0,06109
Chl. A	0,37206	0,19573	Chl. A	0,39744	0,11415	NO3	-0,17275	0,00799
NH4	0,24207	-0,06138	NH4	-0,26951	-0,07755	PO	0,19586	-0,10797
NO3	0,40701	0,0542	NO3	0,20648	-0,02235			
PO	0,3083	-0,1007	PO	0,40624	0,10846			

Tableau B : Résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale des matrices « A » pour les données issus de l'hypolimnion des trois lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Axes Canonique								
Lac Léman			Lac du Bourget			Lac d'Annecy		
I	II		I	II		I	II	
Valeurs propres canoniques								
	2,024	1,100		1,59218	0,3726		0,72167	0,57772
% de la variance des 2 premiers axes de l'ACP								
	54,6536	29,697		37,4263	8,75854		34,1196	27,3138
% cumulatif de la variance des 2 premiers axes de l'ACP								
	54,6536	84,3508		37,4263	46,1848		34,1196	61,4334
Vecteurs propres normalisés								
Bact.	0,14764	-0,08979	Bact.	-0,0665	0,10784	Bact.	0,14887	0,05777
Cyanob.	-0,93776	-0,32921	Cyanob.	0,96921	-0,22923	Cyanob.	0,36661	-0,93037
Euc.	0,31433	-0,93998	Eucar.	0,23708	0,96738	Eucar.	0,91839	0,36203
Position des dates (Mois)								
Fe	0,33752	-0,46071	Fe	1,46815	0,39038	Fe	0,22042	1,08172
Ma	-0,04679	-1,33254	Ma	1,37444	0,65261	Ma	1,42675	0,98213
Av	-0,05616	-1,85667	Av	1,331	1,03378	Av	0,58223	0,23441
Mai	2,69556	-0,93797	Mai	0,54732	0,65839	Av	0,47452	1,13792
Mai	-0,98037	-0,05147	Jl	-2,76293	0,30397	Mai	0,54731	-0,09427
Jn	-0,50966	-0,92867	Jl	0,61732	0,11651	Mai	0,26403	0,19931
Jl	0,01392	-0,95821	Ao	-0,26965	1,18807	Jn	-0,10964	-0,70405
Jl	0,38383	-0,66824	Se	-0,53005	0,885	Jn	-0,373	-0,17355
Ao	1,24301	-1,45955	Se	1,44837	0,41041	Jl	-0,24624	-0,41184
Se	0,96487	-0,21887	No	0,89246	-0,67476	Ao	-0,39301	-0,91077
Oc	-2,33694	0,07757	No	0,34114	0,21288	Se	-1,05355	2,32737
De	-2,44889	-0,02337	De	-0,54378	0,00922	No	-0,17295	0,96586
Ja	0,81358	-1,05728	Ja	0,17349	0,51715	De	-0,47064	-1,04806
Ma	-0,61706	0,22903	Fe	1,1897	-0,1716	Fe	0,60883	-0,03853
Av	-0,46183	0,41413	Ma	-0,09313	-0,97614	Ma	2,03661	-0,1479
Av	0,36803	-0,36049	Av	0,58287	0,11548	Av	1,64261	0,11457
Mai	-1,54483	0,80347	Mai	0,53217	-1,24613	Av	0,60675	-0,54583
Jn	-0,55917	-0,1261	Jn	-0,02258	-1,4779	Mai	0,07841	-0,24894
Jl	-0,01915	-0,1542	Jl	1,52486	0,17143	Mai	-0,86339	0,90837
Jl	-1,07595	3,44013	Ao	1,64894	0,38577	Jn	-0,40075	0,28385
Ao	-1,88959	0,61379	Se	0,79669	0,08721	Jl	0,97402	-0,09702
Se	-0,50742	0,39114	Oc	0,61438	-0,20234	Se	-0,21138	-0,74741
Oc	0,2105	-0,13165	Oc	-1,70286	-0,07523	Oc	-0,47355	-0,71187
Oc	-2,4743	-0,08544	De	1,10793	-0,27273	No	-0,75644	-0,70314
De	1,7397	-0,50014	De	-1,38812	0,29948	De	-2,44388	-0,0129
Ja	1,68531	0,35797	Ja	0,89164	0,37827	Ja	0,18944	1,08855
Ma	0,0895	0,76906	Fe	0,09682	-0,29157	Fe	0,58612	0,32799
Ma	4,46211	2,89914	Ma	-0,52394	0,06749	Ma	1,43598	-0,03191

Av	-1,22152	0,49856	Av	-1,67034	-0,11841	Av	-0,28905	-0,67194
Mai	-0,27877	0,41005	Av	-2,02435	-0,25128	Av	-0,3105	-0,38941
Ju	0,77306	-0,76947	Mai	-1,40034	-0,67834	Mai	-0,13083	-0,477
Jl	-0,01497	0,68594	Mai	-3,63384	0,64694	Mai	-1,12528	-0,23794
Se	0,40636	0,10777	Jl	0,12685	-0,5471	Jn	-1,2349	1,43693
Se	0,8565	0,38329	Jl	-0,70023	0,07714	Jn	0,03742	-0,80042
			Ao	1,02813	-0,99535	Ju	-0,33948	-0,85948
			Se	-0,72519	0,06297	Ju	-0,29616	-0,46529
			Oc	-0,34332	-0,69166	Se	0,16875	-0,27755
						No	-0,18558	-0,28195

Positions des variables explicatives

VLP1	-0,16233	0,39629	VLP1	0,24219	-0,08048	VLP1	-0,06953	-0,22052
VLP2	0,16576	-0,19941	VLP2	0,26553	-0,148	VLP2	0,44716	0,18537
VLP3	-0,25792	0,11209	VLP3	0,24664	-0,06879	VLP3	0,1573	0,22079
VLP4	0,31724	0,00052	VLP4	0,09076	-0,02234	VLP4	-0,19762	-0,06679
Flagel.	0,26481	-0,14368	Flagel.	-0,18394	0,15628	Temp.	-0,24488	-0,07502
Cil.	0,21927	-0,08049	Cil.	-0,07462	0,10066	Chl. A	-0,02525	-0,12392
Temp.	-0,28922	-0,19908	Temp.	-0,20191	-0,13578	NH4	0,03769	0,2444
Chl. A	0,33972	-0,08993	Chl. A	-0,1528	0,01115	NO3	-0,09795	-0,21785
NH4	-0,22367	-0,10822	NH4	-0,2066	0,07627	PO	0,20042	0,16125
NO3	0,22295	-0,08708	NO3					
PO	0,08524	-0,27386	PO	-0,26485	0,04072			

Tableau C : Résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale des matrices « B » pour les données issus de l'épilimnion des trois lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Axes Canonique								
Lac Léman			Lac du Bourget			Lac d'Annecy		
I	II		I	II		I	II	
Valeurs propres canoniques								
	1.16369	0.91812		1.00652	0.62620		1.53986	0.50335
% de la variance des 2 premiers axes de l'ACP								
	31.54970	24.89200		29.27289	18.21195		47.79039	15.62187
% cumulatif de la variance des 2 premiers axes de l'ACP								
	31.54970	56.44170		29.27289	47.48484		47.79039	63.41225
Vecteurs propres normalisés								
VLP1	0,03257	0,62075	VLP1	-0,11204	0,22686	VLP1	0,0662	0,00459
VLP2	0,14494	0,0194	VLP2	0,94293	-0,18074	VLP2	0,99698	0,03746
VLP3	-0,01448	0,78368	VLP3	-0,18152	0,22978	VLP3	-0,01686	0,03958
VLP4	0,9888	-0,01181	VLP4	0,2557	0,92902	VLP4	0,03703	-0,9985
Position des dates (Mois)								
Fe	0,09416	-0,77553	Fe	0,06924	-0,86995	Fe	-0,2574	0,07985
Ma	-0,24536	-1,35498	Ma	0,425	-0,06845	Ma	-0,24459	0,77267
Ma	1,16922	-1,1555	Ma	0,39052	0,05599	Av	-0,4036	-0,41369
Av	-0,1058	-0,32958	Av	1,07022	0,37155	Av	1,42522	-0,72222
Av	-0,05268	-0,31126	Av	0,74167	0,93092	Ma	-0,07595	-0,84881
Mai	0,98613	0,36669	Mai	-1,26297	-2,86947	Ma	-5,24423	-0,09626
Mai	0,01028	-0,76185	Jl	1,09192	0,044	Jn	-0,89398	-0,09442
Jn	0,41787	-0,1724	Jl	-1,82236	0,82994	Jn	0,94123	0,35906
Jl	0,83949	0,9611	Ao	-3,23173	0,59528	Jl	0,70316	-0,70934
Jl	-0,23683	1,16847	Se	0,46239	0,69536	Ao	0,97295	1,15305
Ao	0,6906	0,98636	Se	0,64585	0,92118	Se	-0,23156	0,12728
Ao	1,2242	1,11261	No	1,36004	0,01502	No	0,03541	0,65655
Se	-1,07275	1,11925	No	1,09818	0,35369	De	-0,06693	0,65003
Se	0,23339	1,11502	De	0,50253	0,397	Fe	0,4859	-0,55447
Oc	0,86624	-2,12655	Ja	0,8836	0,39944	Ma	0,26891	-0,65925
No	-0,51914	0,02273	Fe	0,12931	-1,37922	Av	0,05968	-1,24155
De	-1,26861	-0,95184	Ma	-0,00523	-0,70346	Av	1,16002	0,51369

Ja	0,13726	-0,26989	Ma	0,56628	0,05582	Ma	-0,10341	-0,76822
Fe	-0,23923	-0,74755	Av	-0,8334	-0,40556	Ma	0,44974	-0,33131
Ma	0,69567	-0,74803	Mai	-0,52846	-0,16056	Jn	-0,27943	0,56502
Av	0,52801	0,18997	Ju	0,56441	-1,16733	Jl	0,74144	0,26432
Av	-1,05115	0,02609	Jl	0,4166	0,67904	Se	-0,15669	0,6286
Mai	1,57938	0,33696	Ao	0,62283	-0,6269	Oc	0,59719	-0,33716
Jn	-0,18932	1,5944	Se	-1,68976	0,82683	No	0,69223	-0,2879
Jl	1,4147	1,0594	Oc	-2,32195	1,00054	De	1,15591	-0,59183
Jl	0,87027	0,74634	Oc	-0,10306	0,47882	Ja	-0,67326	-0,17714
Ao	0,36297	-0,06738	No	0,3114	0,30205	Fe	1,06523	-0,21249
Se	0,7322	-0,04072	De	-0,72092	0,57591	Ma	0,10238	0,00355
Se	-0,58454	-0,5898	Ja	-0,16432	0,27687	Av	-0,33665	-0,15078
Oc	-0,75659	0,71518	Fe	0,03771	-0,81927	Av	0,30574	2,72626
Oc	-0,5088	-1,18383	Ma	-0,20698	-0,34909	Ma	-3,64709	-0,36782
De	-0,23926	-0,09392	Av	1,20046	0,26479	Ma	-0,74419	0,59531
Ja	0,10511	-0,98839	Av	0,53161	0,09795	Jn	1,14054	0,3159
Fe	-3,99408	-1,06975	Mai	0,00684	-0,29357	Jn	0,06966	-0,21817
Ma	1,07572	-1,23408	Mai	1,25773	0,46231	Ju	0,50539	0,00849
Ma	-0,16417	-1,56286	Ju	-0,40673	0,57327	Ju	0,80831	-0,77847
Av	1,10934	-0,44029	Jl	0,24431	0,549	Se	-0,98155	0,51497
Av	-0,10986	-0,48722	Jl	-0,02656	-1,23354	No	0,65425	-0,3733
Mai	-0,24451	0,60297	Ao	-0,25561	0,71839			
Ju	-3,35651	1,2867	Se	0,3884	-0,7913			
Jl	-0,08377	-0,03761	Oc	-1,43898	-0,73329			
Ao	1,10873	0,92002						
Se	-0,48596	1,7878						
Se	-0,74203	1,38275						

Positions des variables explicatives

Bact.	0,15702	0,38757	Bact.	-0,14979	0,09377	Bact.	0,07973	-0,10576
Cyanob.	-0,21521	0,10615	Cyanob.	-0,26865	0,08291	Cyanob.	0,04626	-0,08757
Euc.	-0,23793	0,41964	Euc.	-0,13028	-0,2169	Euc.	-0,15066	0,14062
Temp.	0,1007	0,0199	Temp.	0,09346	-0,0494	Temp.	0,48248	0,16694
Chl. A	-0,0864	0,09912	Chl. A	-0,05377	0,05412	Chl. A	-0,08399	-0,03441
NH4	0,17859	0,33369	NH4	-0,17161	0,30763	NH4	0,10889	0,10552
NO3	0,1079	0,31144	NO3	-0,21164	0,12071	NO3	0,15596	-0,03357
PO	-0,19391	0,23102	PO	0,189	0,04605	PO	-0,19605	0,13527

Tableau D : Résultats de l'analyse canonique de redondance polynomiale des matrices « B » pour les données issus de l'hypolimnion des trois lacs Léman, du Bourget et d'Annecy.

Axes Canonique								
Lac Léman			Lac du Bourget			Lac d'Annecy		
I		II	I		II	I		II
Valeurs propres canoniques								
5.56228		0.98346	11.15862		0.98016	0.82833		0.46578
% de la variance des 2 premiers axes de l'ACP								
63.12330		11.16071	81.92278		7.19597	25.51950		14.34988
% cumulatif de la variance des 2 premiers axes de l'ACP								
63.12330		74.28400	81.92278		89.11875	25.51950		39.86938
Vecteurs propres normalisés								
VLP1	0,0121	0,04732	VLP1	0,03203	0,1362	VLP1	-0,20914	0,03897
VLP2	0,70123	0,48135	VLP2	0,73728	0,55132	VLP2	0,44022	-0,88154
VLP3	-0,54706	-0,10756	VLP3	-0,52187	0,11961	VLP3	-0,19911	-0,22456

VLP4	0,45699	-0,86862	VLP4	0,42784	-0,81436	VLP4	0,85019	0,41345
Position des dates (Mois)								
Fe	-0,66756	0,64546	Fe	-0,82421	-0,38971	Fe	3,01537	0,5102
Ma	0,22329	-2,28091	Ma	0,16002	-1,00626	Ma	1,54702	-0,22654
Ma	-0,59894	0,2958	Ma	-0,74899	0,45618	Av	0,28079	0,01877
Av	-0,5313	0,3641	Av	-0,57658	-0,62766	Av	0,67276	-0,10738
Av	0,44966	-1,46119	Av	-1,26265	-2,34734	Ma	0,29016	2,31248
Mai	-0,67005	-0,70974	Mai	-2,41579	-0,95729	Ma	0,21602	-0,05292
Mai	0,90717	-2,72902	Jl	-1,26211	-0,56052	Jn	-0,34151	0,13281
Jn	-0,2649	-0,54337	Jl	-1,01233	0,21008	Jn	-0,38136	-0,02902
Jl	-1,06935	0,24496	Ao	-0,30153	-0,10656	Jl	-0,58027	-0,14381
Jl	-1,17294	0,25021	Se	-0,79843	0,21611	Ao	-0,63172	0,03194
Ao	0,1241	-0,17019	Se	-0,78031	-0,28402	Se	-0,40186	0,0514
Ao	-1,93407	1,54208	No	-0,6087	-0,88783	No	-1,57364	-1,04716
Se	14,3447	1,2008	No	-0,83075	0,41363	De	1,00313	-0,65629
Se	0,68535	-1,7715	De	-1,03953	1,02147	Fe	-0,9477	1,11637
Oc	0,9401	1,3916	Ja	-1,20333	0,95946	Ma	-0,85519	-0,99133
No	-1,03815	0,61375	Fe	-0,09326	0,67305	Av	-0,96992	-0,33038
De	0,75827	-0,4218	Ma	0,17215	-0,6878	Av	0,07116	-0,69861
Ja	-2,12964	2,18854	Ma	0,03014	0,70829	Ma	0,07308	-0,26643
Fe	-0,94615	0,36562	Mai	-1,38024	-0,65845	Ma	0,04615	1,77226
Ma	0,03423	0,71861	Ju	0,65191	-1,47917	Jn	-0,06828	-1,08713
Av	-0,46832	-0,6293	Jl	0,46912	0,40802	Jl	0,53802	-0,22329
Av	-0,15352	0,36684	Ao	1,48501	-1,51371	Se	1,00652	-0,23085
Mai	-1,33874	0,50604	Se	-0,96132	-0,29586	Oc	-1,54473	-0,24597
Jn	-0,94517	0,21285	Oc	0,09297	0,03257	No	0,10086	0,28702
Jl	-0,73671	-0,11351	Oc	-0,55946	0,32532	De	-1,72694	0,9545
Jl	-1,11875	0,57496	De	-1,26994	-0,51366	Ja	0,42045	-0,10632
Ao	-0,19412	0,41263	Ja	-0,55704	0,0411	Fe	-0,00506	0,3022
Se	-0,11809	-0,86547	Fe	-1,0281	1,65642	Ma	0,47111	-0,26943
Se	0,58351	0,03858	Ma	-1,77457	3,06894	Av	-0,32287	-0,2275
Oc	-1,32111	-0,10418	Av	-0,74793	0,38725	Av	-0,63607	-0,03688
Oc	1,05318	1,4475	Av	-0,3767	-0,42114	Ma	1,0963	-0,59332
De	-1,93461	1,13465	Mai	-0,59085	-1,0039	Ma	0,72612	-0,12551
Ja	-0,39033	-0,2257	Mai	-1,17435	0,8711	Jn	0,28403	-0,18679
Fe	-0,34577	0,22439	Ju	-1,33248	-0,07091	Jn	-1,18079	0,05451
Ma	0,12966	0,43597	Jl	-0,2385	0,27926	Ju	0,03076	-0,24056
Ma	1,24455	-2,05023	Jl	-1,07318	0,86859	Ju	-0,15201	0,08326
Av	-0,2598	-0,31382	Ao	-1,3587	1,51167	Se	0,64021	-0,38113
Av	0,96396	0,05414	Se	-2,31718	-1,54973	No	-0,2101	0,87683
Mai	-0,0902	-0,55386	Oc	-0,98644	0,87046			
Ju	-0,61332	0,0799						
Jl	-0,34958	-0,17718						
Ao	-0,93224	0,25484						
Se	-0,26117	-0,68724						
Se	0,15288	0,24339						
Positions des variables explicatives								
Bact.	-0,38214	0,18365	Bact.	-0,53321	0,10806	Bact.	-0,31821	-0,12517
Cyanob.	0,47388	-0,21409	Cyanob.	0,77898	-0,09685	Cyanob.	0,19817	0,19407
Euc.	-0,41686	0,02023	Euc.	-0,81585	0,03744	Euc.	-0,27123	-0,18145
Temp.	-0,07483	-0,04984	Temp.	-0,43007	0,08761	Temp.	0,0725	0,11267
Chl. A	0,74545	0,0624	Chl. A	0,88291	0,01297	Chl. A	-0,14552	-0,09684
NH4	0,22646	0,04185	NH4	-0,36755	-0,06254	NH4	-0,18018	0,07913
NO3	0,74545	0,0624	NO3	0,90468	0,0135	NO3	-0,14552	-0,09684
PO	-0,23212	-0,02665	PO	-0,38689	0,17069	PO	0,05951	0,07124

- ANNEXE V -

Protocole détaillé d'extraction, de PCR et de DGGE

(Descriptif du Protocol : utilisé et adapté avec l'autorisation de l'auteur original U. Dorigo)

I. Principe

La technique de DGGE est aujourd'hui largement utilisée pour apprécier la diversité de différentes populations de micro-organismes dans des échantillons naturels après amplification de leur ADN 16S ou 18S (Muyzer 1993). Cette technique permet la comparaison d'échantillons différents, sur la base d'une empreinte moléculaire, et l'identification des souches présentes dans un échantillon par comparaison du profil de migration avec des profils obtenus sur des cultures pures, par séquençage des bandes après excision (Ferris *et al.* 1996) ou par hybridation sur le gel à l'aide de sondes spécifiques (Muyzer *et al.* 1995). Cette technique est basée sur le fait qu'un ADN double brin se dissocie lorsqu'il est soumis à des fortes températures ou/et à des dénaturants chimiques. La température de dissociation ou de fusion d'un ADN double brin est fonction des liaisons d'hydrogène entre un couple de bases complémentaires et de l'attraction entre bases avoisinantes sur le même fragment. Les ADN riches en liaisons G-C (3 liaisons hydrogènes) ont une température de fusion plus élevée que les ADN riches en liaisons A-T (2 liaisons hydrogènes). La molécule d'ADN aura donc une température de fusion (T_m) qui variera selon les domaines en fonction de sa séquence nucléique. Deux molécules d'ADN proches (même taille), différent d'un seul nucléotide dans une zone à faible température de fusion, auront deux T_m différentes. Cette modification de T_m et donc de séquence est mise en évidence par l'électrophorèse dans un gradient croissant d'agent dénaturant (urée et formamide).

L'ADN chargé négativement, migre dans un gel de polyacrylamide vers le pôle positif et vers des concentrations de dénaturants croissantes jusqu'à ce que les domaines de la double hélice d'ADN à faible T_m se dissocient. Cette structure reste emprisonnée dans la matrice du gel. La séparation complète de la double hélice en deux fragments est empêchée grâce à la présence d'un domaine à forte température de fusion que l'on crée de façon artificielle en incorporant à la molécule une extrémité riche en GC. Cette étape est accomplie durant l'amplification de la séquence en PCR en utilisant une amorce spécifique de la région d'ADN à étudier et portant en 5' une succession d'environ 40 GC : le GC clamp ou queue GC. Plus une séquence est riche en bases G et C, plus difficile sera la dissociation ; ainsi sa migration sera stoppée plus tardivement dans le gel, par rapport à une séquence moins riche en GC.

La mise au point de la technique réside essentiellement dans le choix des amorces (la taille du fragment amplifié devra être comprise entre 100 et ca. 700 pb ; le GC clump doit être proche des domaines à forte T_m) et dans la préparation du gel (pourcentage de gel, gradient de dénaturation, tension et durée d'électrophorèse).

Nous avons utilisé la technique de DGGE pour apprécier les modifications de structure bactérienne suite au fractionnement des communautés et à l'enrichissement d'enceintes en particules virales lors des deux expériences menées au Léman. Lors de ces analyses, après extraction du matériel ADN des cellules bactériennes et amplification de ce matériel par PCR des profils multi-bandes en DGGE ont été obtenus. Chaque bande a été considérée comme représentative d'une séquence et donc d'un phylotype. Le nombre de bandes nous a renseigné sur la richesse spécifique d'une communauté. La DGGE permet également une analyse semi-quantitative, car les bandes apparaissent plus ou moins intenses selon l'abondance relative du fragment amplifié et donc selon l'abondance relative des espèces présentes dans un échantillon. Nous nous sommes contenté d'une analyse plus qualitative. Les protocoles

détaillés ci-dessous sont ceux mis en place par U. Dorigo dans l'Equipe d'Ecologie Microbienne Aquatique lors de sa thèse (Dorigo 2005).

II. Protocole d'Extraction et de PCR

II.1 Extraction et purification de l'ADN Eubactérien

Cette étape est indispensable afin d'extraire l'ADN eubactérien et éliminer tous les éléments indésirables comme les protéines, les lipides, etc. De manière général, la méthode d'extraction devra lyser de façon efficace l'ensemble des parois microbiennes, sachant que la paroi des Gram+ est plus résistante que la paroi des Gram- et que les Archaea ne possèdent pas de peptidoglycane et sont donc insensibles à l'action du lysozyme. De plus, des composants présent dans l'échantillon, tels que les matières organiques, métaux, argiles, etc. peuvent se fixer sur l'ADN et réduire ainsi l'efficacité d'extraction. Le protocole que nous avons utilisé combine des méthodes physiques (cycles de congélation-décongélation, sonication, utilisation du vortex) de lyse chimique (tampon de lyse, détergeants, phénol) et de lyse enzymatique (la lysozyme catalyse l'hydrolyse des polysaccharides ; la protéinase K catalyse l'hydrolyse des protéines). Afin d'analyser la diversité des eubactéries libres nous avons extrait le filtre 0,2 µm conservé à -20°C. Il s'agit d'une version modifiée du protocole décrit par Massana *et al.* (1997).

II.1.a Extraction de l'ADN eubactérien

- Chaque microtube contenant le filtre à analyser, reçoit 750 µL de tampon de lyse (Lysis buffer : 40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl and 0,75 M Sucrose, conservé au congélateur).
- Les échantillons sont placés debout pendant 15 min à -80°C puis pendant 2 min dans un bain marie à 55°C, suivi ensuite de 2 minutes dans un bain à ultrasons
- Ces échantillons sont ensuite vortexés et centrifugés à maximum vitesse pendant quelques secondes (GC-15R Centrifuge, Beckman) : speed-down
- Les échantillons reçoivent 47 µL de lysozyme (20 000 U/mg, concentration finale de 2,4 mg/mL, *Eurobio*, conservé dans des aliquotes au congélateur) pour être ensuite placés pendant 45 minutes dans une armoire thermostatée à 37°C sous agitation douce (200 g).
- Speed-down
- 75 µL de SDS 10 % (température ambiante ; agent dénaturant des protéines et lipides membranaires) et 10 µL de protéinase K (32 U/mg, *Eurobio*, conservé au congélateur) sont ajoutés.
- Les eppendorfs sont mis pendant 1h30 dans un bain marie à 55°C
- Speed-down

II.1.b Purification d'ADN eubactérien

Après l'extraction, l'ADN se retrouve en suspension avec tous les autres composants cellulaires. La purification a comme but de séparer l'ADN de ces constituants.

- Les échantillons sont transférés sans le filtre dans des microtubes de 2 mL.
- Les lysats sont purifiés deux fois par extraction avec un volume égal de phénol chloroform-isoamyl alcool (25 : 24 : 1, pH 8.0, Sigma, conservé au frigo). En pratique, on ajoute un volume égal de phénol-chloroform-isoamyl alcool en mélangeant

soigneusement les deux. Centrifuger le tout à maximum vitesse (21.000 g) et 4°C pendant 10 min. Récupérer la phase supérieure dans un eppendorf 2 mL et répéter cette étape une nouvelle fois.

- Le phénol résiduel, qui peut agir comme inhibiteur dans l'amplification de l'ADN, est éliminé avec un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique (Sigma, conservé à température ambiante). Centrifuger à vitesse maximale et à 4°C pendant 10 min.
- Récupérer la phase supérieure. Les acides nucléiques contenus dans cette phase sont concentrés par précipitation et solubilisation dans un volume donné de tampon d'élution TE

II.1.c Précipitation et solubilisation de l'ADN

Cette étape purifie/concentre des solution d'ADN ou des produits de PCR

- La solution d'ADN est mélangée premièrement à 10% du volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2 ; conservé au frigo) ; l'acétate de sodium est un co-précipitant d'ADN
- On ajoute 200% de volume d'éthanol absolu froid (conservé à -20°C). Mélanger par inversion du tube.
- Les échantillons sont placés debout, au congélateur à -80°C pendant la nuit
- Centrifuger tous les échantillons pendant 30 minutes à 21.000 g à 4°C.
- Jeter le surnageant
- Laver le culot avec 300 µL d'éthanol à 80 % pour enlever les sels d'acétate de sodium qui pourraient inhiber les étapes d'amplification d'ADN
- Les tubes sont re-centrifugés pendant 10 min à 21.000 g à 4°C
- Répéter l'étape 5)
- Le culot est ensuite séché au speed-vac (Speed vac, Savant) pendant 20 à 40 minutes
- Selon l'importance du culot ajouter de 30 (pas ou peu de culot) à 100 µl de TE (10 mM Tris ; 1 mM EDTA ; pH 8)
- Afin de solubiliser l'ADN, les tubes sont placés au bain marie pendant 2 h à 37°C

II.2 Dosage de la quantité d'ADN eubactérien par spectrométrie

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

II.2.a Principe

- La densité optique à 260 nm permet de calculer la quantité d'ADN extrait.

A 260 nm, une DO de 1 correspond approximativement à 50 µg/mL d'ADN et à 25 µg/mL pour l'ADN simple brin. La mesure de l'absorbance de l'ADN doit être comprise entre 0,1 et 1 pour que l'on soit dans la partie linéaire de la relation entre l'absorbance et la concentration en ADN ; effectuer des dilutions si la DO est supérieure à 1 (une première dilution au 1/10 ou 1/20 avec de l'eau stérile est préconisée).

- La densité optique à 280 nm permet de vérifier la pureté de l'ADN extrait.

La valeur du rapport DO260/DO280 doit être comprise entre 1,8 et 2 pour des ADN purs. Cela veut dire que l'absorbance mesurée est due entièrement à la présence d'ADN. Des contaminations par des protéines provoquent une baisse rapide de ce rapport; une baisse de plus de 20 % correspond à une mauvaise préparation. Précipiter l'ADN à nouveau afin de purifier l'ADN. Le phénol ou le chloroforme quant à lui augmente ce rapport. Précipiter l'ADN.

II.2.b Protocole

- Faire le blanc avec de l'eau stérile (dans des aliquotes au congélateur) en introduisant 80 µl d'eau dans la cuve de spectrométrie et suivre les indications du fournisseur pour connaître la valeur de la DO. Enlever l'eau de la cuve
- Une dilution de l'échantillon est effectuée avec la même eau stérile au 1/80^{ème} : prélever 1 µl d'ADN et ajouter 79 µl d'eau, bien mélanger
- Charger tout le volume à l'intérieur de la cuve spectrophotométrique et lire les valeurs de DO, de rapport et de pureté
- Faire en dernier une mesure d'un témoin : de l'ADN de Calf Thymus (Invitrogène, 10 mg/mL, conservé au congélateur) afin de vérifier la justesse de l'appareil

Remarque : Si à la suite des mesures par spectrométrie des dilutions de la solution mère s'imposent pour les analyses suivantes (PCR, clonage..), utiliser comme diluant soit du TE (bon conservant d'ADN), soit de l'eau stérile (attention, problème de hydrolyse, donc dommages à d'ADN)

II.3 Amplification par PCR

II.3.a Principe de la PCR

La PCR ou réaction enzymatique de polymérisation en chaîne permet d'amplifier un fragment d'ADN de façon spécifique et exponentielle (Innis *et al.*, 1990). Cette technique consiste à répliquer grâce à des amorces spécifiques, un fragment d'ADN.

La PCR se déroule en trois étapes :

- La dénaturation : c'est la séparation des deux brins d'ADN par un choc thermique (94°C)
- L'hybridation de l'ADN : Le couple d'amorces va se fixer de manière spécifique à la matrice d'ADN simple brin grâce à un refroidissement pour atteindre la température optimale d'hybridation des amorces, généralement autour de 55°C.
- L'élongation ou polymérisation : La réaction est chauffée à 72°C, température à laquelle l'activité de la Taq polymérase, une ADN polymérase thermorésistante, est maximale et l'ADN double brin est reformé.

Ces trois étapes sont répétées n-fois (en général une trentaine de fois), le fragment d'ADN est ainsi répliqué 2ⁿ fois.

II.3.b Préparation des solutions de travail

Amorces (Q-Biogène, Evry) :

La solution stock (100 µM concentration finale): A réception des amorces lyophilisées, ajouter du tampon TE afin que la solution finale du stock soit de 100 µM. Conserver au congélateur

La solution de travail (12,5 μ M concentration finale): une solution de 800 μ L est préparée avec 100 μ L de la solution stock de 100 μ M) et 700 μ L du tampon TE ou de l'eau stérile. Conserver au congélateur.

dNTP (Pharmacia) :

10 μ L de chaque nucléotide (A, G, C, T) sont mélangés avec 460 μ L d'eau stérile. Conserver au congélateur.

Bovine Serum Albumin (BSA ; *Sigma A-7030*) :

Des aliquots de 10 mg/mL de BSA sont préparées avec de l'eau stérile.

II.3.c Protocole détaillé

- Calculer le volume de chaque ingrédient pour la préparation du PCR-mix : En tenant compte du nombre des échantillons à analyser (les échantillons, un témoin négatif et un témoin positif)
- Faire un speed-down rapide de tous les ingrédients conservés au congélateur et les poser sur de la glace
- Distribuer les échantillons d'ADN dans des tubes à PCR (1 μ L ici)
- Préparer un mélange de tous les réactifs (Tableau A) dans un eppendorf stérile pour obtenir un volume réactionnel de 50 μ L (25 μ L ou voir 100 μ L) * n, où n est le nombre d'échantillons. L'ordre dans lequel sont ajoutés les ingrédients au mix n'est pas important, sauf pour la *Taq* polymérase qui doit être ajoutée en dernier pour éviter des amplifications non spécifiques. Par exemple pour un volume de 50 μ L et un échantillon :

Tableau A: Exemple de composition du mélange utilisé en PCR pour un échantillon et un volume réactionnel de 50 μ L (-1 μ L d'ADN).

Ingrédients	Volume (en μ L)	Concentration finale
Eau stérile**	28,75	
Tampon 10X (<i>Eurobio</i>)	5	
dNTP	3	120 μ M de chaque nucléotide
MgCl ₂ (<i>Eurobio</i>)	1,5	1,5 mM
Amorce sens (12.5 μ M)	4	1 μ M
Amorce antisens (12.5 μ M)	4	1 μ M
BSA ***	2,5 μ L	0,5 mg/mL
<i>Taq</i> polymérase (<i>Eurobluetaq</i> , <i>Eurobio</i>)	0,25	1,25U

** : quant on augmente le volume d'un réactif à exception de l'eau, on diminue de la même quantité le volume d'eau ; *** : L'utilisation du BSA est préconisé lorsqu'on s'attend à trouver des impuretés qui peuvent inhiber l'amplification en PCR ou lors des analyses en DGGE. Dans des PCR « normales » l'emploi de BSA n'est pas nécessaire, son volume est donc à remplacer par de l'eau stérile.

- Bien mélanger tous les ingrédients du mix
 - Pour un volume réactionnel de 50 μ L, répartir dans chaque tube à PCR 49 μ L du mix et mélanger soigneusement
 - Places les tubes dans le thermocycleur (Thermal Cycler T-Personal, *Biometra*) et choisir le programme
- Caractéristiques des amorces utilisées pour amplifier la région d'ADN d'intérêt :

Tableau B: Caractéristiques des amorces utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité eubactérienne (P78-P79). Les chiffres en gras correspondent à nos propres appellations.

Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Référence bibliographique
P78 ou 358GC*	GCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer (1993)
P79 ou 907RM*	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	Schauer <i>et al.</i> (2003)

*Les chiffres se réfèrent à la position des amorces sur le 16S d'*Escherichia coli*

-Caractéristiques des programmes PCR utilisés pour amplifier la région d'ADN d'intérêt :

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

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

II.3.d Electrophorèse en gel d'agarose

Grâce à l'utilisation d'un marqueur de taille appropriée l'électrophorèse en gel d'agarose permet de vérifier la qualité, la nature de l'ADN mais aussi d'évaluer la taille approximative de l'ADN extrait et/ou amplifié. Les fragments chargés dans des puits au sein du gel d'agarose et soumis à un courant électrique, vont migrer vers l'anode (pôle positive de la cuve d'électrophorèse) à cause de leur charge négative. Le gel d'agarose contient du TBE 0,5 X, de l'agarose en poudre et du bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant qui permet, après migration de l'AND, de visualiser l'ADN sous lumière UV. La quantité d'agarose dans un volume donné, dépend de la taille des fragments analysés (Tableau D). En général, plus petit est le fragment d'ADN, plus fort sera le pourcentage d'agarose.

Tableau D: Pourcentage d'agarose conseillé pour l'analyse de tailles différentes d'ADN.

Taille des fragments d'ADN	% d'agarose dans le gel	1.1.1.1.1 Remarques
<500 pb	1,2%-1,5% (0,6-0,75 g dans 50 mL)	
500-800 pb	1%-1.2% (0,5-0,6 g dans 50 mL)	Notre cas
800 pb-2000 pb	0,8%-1% (0,4-0,5 g dans 50 mL)	
2000 pb-6000 pb	0,7%-0,8% (0,35-0,4 g dans 50 mL)	Pour vérifier la qualité des extraction d'ADN

Préparation d'un gel de 1 % d'agarose et migration

- Peser 0,5 g d'agarose
- Mesurer 50 mL de tampon TBE 0.5X et mélanger à l'agarose
- Faire bouillir 45 seconds aux micro-ondes
- Refroidir à 50 °C
- Préparer le moule d'électrophorèse

- Ajouter une goutte de bromure d'éthidium (conservé à 4°C; *Eurobio*) au mélange TBE-agarose et mélanger. Ce colorant présente une fluorescence orange lors d'une exposition aux rayons UV, quand il est intercalé entre les bases des acides nucléiques.
- Couler le gel dans le moule
- Le gel se solidifiera après *ca.* 45 minutes à température ambiante ou après *ca.* 20 min au frigidaire. Une fois solidifié, retirer délicatement les peignes, mettre le gel dans son portoir dans la cuve d'électrophorèse remplie avec du TBE 0,5 X
- Mélanger une goutte de tampon de charge (GBL5X) et 4 µl de produit de PCR eubactérien ou 13 µl de produit de PCR de cyanophages. Poser ce mélange dans un puits du gel
- Déposer dans chaque rangée du gel, 4 µL de marqueur de taille 100 pb* (*Invitrogen*, 1 µg/µl, au congélateur) dilué 10 fois dans du TE (20 µl et 180 µl TE, conservé à température ambiante)
- Faire migrer pendant 30 minutes au minimum à 100 volts
- Arrêter la migration
- Observer le gel à la plaque UV (TEX-35M, *Bioblock Scientific*)
- Une photo numérique est prise (*Kodak DC290*) et sauvegardée (*Edas 290, Kodak*)
- La comparaison du marqueur avec les fragments nous permettra d'attribuer une taille aux fragments de PCR et de vérifier si l'amplification est spécifique

* Il est également possible de quantifier les fragments amplifiés :

- Déposer 5 µl de produit PCR avec du GBL dans un puit du gel
- Pour évaluer la quantité amplifiée, déposer dans la même rangée 5 µl d'un marqueur de taille et de quantité d'ADN (low mass ladder, *Invitrogen*) qui a été dilué au préalable (20 µl de low mass ladder et 30 µl d'eau stérile)
- Estimer la quantité d'ADN dans le produit PCR présent après migration : Le standard de taille résulte en fragments de 5-10-20-40-60-100 ng d'ADN de 100-200-400-800-1200-2000 pb de taille respectivement

III. Protocole de la DGGE

III.1 Préparation des plaques à DGGE (Système CBS Scientific)

Les plaques à DGGE doivent être lavées soigneusement et dans un ordre bien précis :

- avec du savon doux et de l'eau du robinet (bi-permutée si possible)
- de l'eau ultra pure

- Sécher les plaques avec du sopalin
- Nettoyer les plaques avec de l'éthanol à 96 % pour éliminer toutes les impuretés qui risqueraient de provoquer des irrégularités dans le gel et de fausser la migration des échantillons
- Sécher à nouveau avec du sopalin
- Poser les plaques sur les supports en plastique

III.2 Préparation du système à DGGE

III.2.a Préparation du gel sandwich

- Des espaceurs (angl. spacer) pour le gel d'1 mm (ou 0,75 mm) sont enduits (sur les deux faces) avec de la vaseline sur le bord extérieur afin de créer une barrière plus étanche et d'isoler les cotés du gel du courant (sans cela les bandes risquent d'être moins nettes). Les spacer sont placés près du joint. La courbure du spacer épouse la forme de la courbure de la plaque.
- La plaque échancrée est placée dessus, en commençant par le bas
- Prendre des pinces et clipser les deux plaques ensemble en commençant par le bas à gauche et à droite, puis milieu, ensuite 1 pince coté bas à gauche et 1 coté gauche bas à droite, puis 2 pinces sur chaque coté: Au total 3 pinces en bas et 3 sur chaque coté
- Mettre les plaques en position verticale

III.2.b Préparation du système d'écoulement

Le gel sera coulé par gravité :

- Placer la chambre de mélange (angl. : gradient maker) sur la plaque d'agitation (la différence entre cette chambre de mélange et le haut du gel sandwich doit être de 10 cm *ca*)
- Mettre un petit agitateur dans le compartiment 1 de la chambre d'agitation
- Adapter le robinet sur la chambre. Un tuyau sera mis à la sortie du robinet et aura un adaptateur à seringue à l'autre bout. Ajouter une aiguille de seringue qui puisse s'insérer entre les deux plaques à DGGE à l'adaptateur
- Positionner la seringue entre des deux plaques au milieu de celles-ci, la fixer avec une pince métallique et vérifier que le tuyau soit bien tendu



Figure A : Photo du système d'écoulement, 1 –Compartiment 1, 2 –Compartiment 2, 3 –Plaques montées.

III.3 Préparation des solutions de dénaturation

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

- Pour l'analyse de la diversité eubactérienne dans un gradient de 40 à 80% voici les détails pour la constitution de trois solutions de dénaturation filles et cela pour un gel de 1 mm (Tableau E) et de 0.75 mm d'épaisseur (Tableau F) :

Tableau E : Composition d'un gel de 1 mm d'épaisseur et contenant un gradient de 40-80% (analyse de diversité eubactérienne). Le 0% servira à remplir le haut du gel.

1.1.1.1.2 Les solutions filles	80% sol. mère	0% sol. mère	Temed	APS	GBL 5X
0		6 mL	6 µl	30 µl	
40	6 mL	6 mL	11 µl	60 µl	
80	12 mL		11 µl	60 µl	80 µl

Tableau F : Composition d'un gel de 0.75 mm d'épaisseur et contenant un gradient de 40-80% (analyse de diversité eubactérienne). Le 0% servira à remplir le haut du gel.

1.1.1.1.3 Les solutions filles	80% sol. mère	0% sol. mère	Temed	APS	GBL 5X
0		6 mL	6 µl	36 µl	
40	4,4 mL	4,4 mL	8 µl	45 µl	
80	8,75 mL		8 µl	45 µl	80 µl

Exemple de la préparation des solutions filles pour les eubactéries :

- Disposer trois flacons vides marqués 0, 40 et 80% dans de la glace
- Disposer dans le bac également les solutions mères à 0 et 80% (frigo), le TEMED (frigo) et un aliquot d'APS (congélateur)
- Préparer les solutions filles selon le schéma ci-dessous
 - o distribuer le 0% mère et puis le 80%

- o ajouter le TEMED,
- o ajouter l'APS dans les solutions 40% et 80 %
- o inverser une fois les tubes afin de mélanger le contenu

III.4 Mise en place du gel de DGGE

- Sur la chambre à mélange vérifier la fermeture des sorties
- Ajouter la solution la plus concentrée dans le compartiment 1, près de la sortie
- Ajouter la solution la moins concentrée dans le compartiment 2
- Ouvrir l'interconnexion entre les deux chambres
- Faire une sous-pression sur le compartiment 2 afin que la solution la plus concentrée puisse passer à gauche une fois la sous-pression enlevée
- Mettre en route l'agitation
- Ouvrir le robinet de sortie et mettre le chronomètre en route
- Quand tout le liquide s'est écoulé, arrêter l'agitation et le chronomètre
- Ajouter l'APS dans la solution fille 0 %
- Ajouter la solution fille 0% dans le compartiment de sortie
- Faire écouler la solution 0 %, laisser déborder légèrement du gel sandwich, fermer le robinet, sortir l'aiguille
- Ajouter selon l'épaisseur du gel, le peigne 1 mm (16 puits) ou 0,75mm (20 puits)
- Après 20 min revenir afin de s'assurer que les niveaux à gauche et à droite du peigne n'aient pas baissé. Au cas où ça arrive, préparer du 0 % fille et remplir les cotés à gauche et à droite (cette technique assure une bonne qualité des puits)
- La polymérisation se fait ensuite en 3 heures (ce gel peut se conserver pour un maximum d'un jour si conservé à l'intérieur du bac afin d'éviter le dessèchement). La qualité du gel se dégrade rapidement.
- Allumer le bain marie réglé à 60°C. S'assurer que le bac contient bien 20 L, sinon ajouter de l'eau bi-permutée afin de compléter le niveau.

III.5 Préparation de la migration

Quant le gel est polymérisé et le tampon du bac est à 60°C :

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

III.6 Réalisation des dépôts

Charger seulement les produits PCR qui donnent un signal lors de l'analyse en électrophorèse dans un gel d'agarose ! Charger la même quantité d'ADN dans chaque puit à DGGE. Eviter de préférence de charger le premier et surtout le dernier puit

- Mélanger du GBL5X (5-7 µl) avec le produit de PCR. Dans la littérature 600–800 ng d'ADN par puits sont conseillés. Charger ce mélange à l'intérieur d'un puit.
 - Brancher l'électrode (noire) sur le haut du portoir et laisser migrer à 100V
 - Après 20 min (pour 1 gel) contrôler que les échantillons soient rentrés dans la matrice du gel. Si oui, enlever le régulateur du flux
- La migration dure 16 h (à 100 volts) dans le cas des eubactéries (Schauer *et al.* 2000).

III.7 Arrêt de la migration et révélation

- Enlever le tuyau d'arrivée du tampon et débrancher la cathode
- Enlever le portoir du gel du bac et le gel sandwich du portoir
- Enlever le joint et les spacers
- Ecarter les deux plaques sans casser le gel et repérer la plaque qui contient le gel. Elle reste couchée, la seconde est enlevée
- Avec un spacer enlever la rangée des puits et faire une encoche au niveau du dernier puit afin de repérer l'ordre de chargement des échantillons
- Mettre la plaque qui contient le gel, à plat, dans une bassine, et mettre celle-ci dans à l'abri de la lumière
- Préparer la solution de coloration dans un tube qui contiendra 20 mL de TAE 1X et 3 à 4,5 µl de SYBRGold (1 : 5.000 concentration finale ; SYBRGold conservé dans des aliquotes de 30 µl au congélateur)
- Répandre cette solution au dessus du gel de façon homogène
- Laisser agir au total 45 min
- Placer la plaque contenant le gel dans un bac contenant une plaque colorée (pour mieux voir le gel) et contenant suffisamment d'eau ultrapure propre
- Avec des mouvements de va et vient le gel se détache de la plaque. Celle-ci sera retirée doucement
- On soulève la plaque colorée contenant le gel
- Avec un morceau de sopalin qui est posé sur le gel, le gel est récupéré et déposé sur une plaque en plexiglass transparente aux rayons UV (TEX-35, Bioblock Scientific)
- Enlever le sopalin doucement (si difficultés verser de l'eau ultrapure sur le sopalin) et enlever les bulles d'air au dessous du gel en aspergeant le gel avec de l'eau ultrapure : les bulles peuvent être déplacées avec une pression des doigts
- Exposer quelques secondes le gel aux rayons UV (à 70%) afin de voir si nous avons des profils exploitable
- Prendre avec l'appareil photo (Kodak DC290) une photo format 16-21 cm et 4.5 sec de temps d'exposition
- Avec Microsoft Photo Editor optimiser les paramètres de luminosité et de contraste afin d'optimiser l'image

IV. Analyse des gels de DGGE

Tout d'abord nous allons créer un fichier sous Excel où on mettra en colonne les différentes bandes qui sont observées dans l'ensemble du gel ; en ligne on mettra les échantillons. Les cases seront remplies en observant chaque profil de DGGE. Si l'observation visuelle ne suffit, utiliser le logiciel GeneTools (SynGene) : Analyse qualitatif du gel (présence/absence sera noté 1/0) ; Analyse semi-quantitative (intensité maximale/ intensité moyenne/ intensité faible/ absence sera noté 3/2/1/0)

- Ce tableau pourra être analysé par utilisation du logiciel ADE-4 en faisant une analyse :

-de correspondance
-hiérarchique de Ward (cluster)

- Nous pouvons faire également une analyse de Sorensen pour évaluer le degré de similarité entre deux échantillons selon la formule $C_s = 2j/(a+b)$, avec a le nombre de bandes dans l'échantillon A, b le nombre de bandes dans l'échantillon B et j le nombre de bandes communes à A et B. Une valeur de 0 indique que les échantillons sont complètement différents et une valeur de 1 indique qu'ils sont identiques.

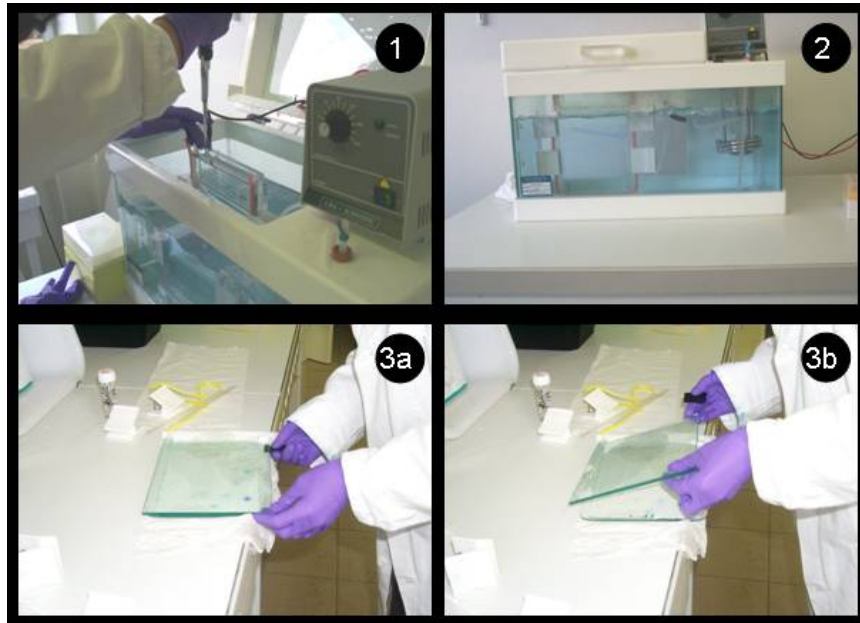


Figure B : Photos de quelques étapes en DGGE : Dépôt des échantillons dans les puits d'un gel de DGGE (1) ; La cuve à DGGE contenant le système de gel (2) ; Décollage des deux plaques afin de récupérer le gel contenu à l'intérieur de ce sandwich en fin de migration (3a-3b)