



**HAL**  
open science

**DIVERSITE COMPAREE DES COMMUNAUTES  
BACTERIENNES ETVIRALES DANS LES GRANDS  
LACS ALPINS ET ETUDE DESFACTEURS ET  
PROCESSUS IMPLIQUES DANS  
LASTRUCTURATION DE CES COMMUNAUTES**

Ursula Dorigo

► **To cite this version:**

Ursula Dorigo. DIVERSITE COMPAREE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ETVIRALES DANS LES GRANDS LACS ALPINS ET ETUDE DESFACTEURS ET PROCESSUS IMPLIQUES DANS LASTRUCTURATION DE CES COMMUNAUTES. Ecologie, Environnement. Université de Savoie, 2005. Français. NNT: . tel-00138176

**HAL Id: tel-00138176**

**<https://theses.hal.science/tel-00138176>**

Submitted on 23 Mar 2007

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

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

UNIVERSITE DE SAVOIE

**THESE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR EN

BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ECOSYSTEMES

PAR

**URSULA DORIGO**

SOUTENUE PUBLIQUEMENT

Le 21 Septembre 2005

**DIVERSITE COMPAREE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET  
VIRALES DANS LES GRANDS LACS ALPINS ET ETUDE DES  
FACTEURS ET PROCESSUS IMPLIQUES DANS LA  
STRUCTURATION DE CES COMMUNAUTES**

**Devant le Jury composé de :**

|                 |   |                        |
|-----------------|---|------------------------|
| HUMBERT J.F.    | DR, INRA, Thonon-les-Bains              | Directeur de thèse     |
| FONTVIEILLE D.  | DR, Université de Savoie, Aix-les-Bains | Directeur de thèse     |
| LEROUX, X.      | DR, Université C. Bernard               | Rapporteur             |
| DEL GIORGIO, P. | Prof, Université de Québec              | Rapporteur             |
| GASOL, J.M.     | Dr, CSIC, Barcelona                     | Examineur et Président |
| FROMIN N.       | CR, CNRS, Montpellier                   | Examineur              |
| DEBROAS D.      | Prof, Université Blaise Pascal, Aubière | Invité                 |



**DIVERSITE COMPAREE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET  
VIRALES DANS LES GRANDS LACS ALPINS ET ETUDE DES  
FACTEURS ET PROCESSUS IMPLIQUES DANS LA  
STRUCTURATION DE CES COMMUNAUTES**



*« All the world is a phage »*

*W. Shakespeare*



## REMERCIEMENTS

Après plusieurs années de travail passionnant et d'efforts également, voici mon travail de thèse achevé. Un certain nombre de personnes ont contribué au bon déroulement professionnel et à mon bien-être personnel. Je tiens à les remercier ici.

Tout d'abord, je tiens à remercier **Jean-Marcel Dorioz** et **Jean Guillard** pour m'avoir accueilli aussi généreusement au sein de la station de recherche INRA de Thonon, pour leur esprit pragmatique et leurs qualités humaines que j'apprécie vraiment. Merci tout particulièrement à mes directeurs de thèse sans lesquels ce projet n'aurait pas pu se parfaire et être financé. Je suis profondément reconnaissante à **Jean François Humbert** pour son enthousiasme scientifique, sa confiance et ses critiques qui m'ont toujours poussées à aller au delà de mes limites. Merci à **Dominique Fontiville** pour sa confiance et son aide surtout en fin de thèse.

Je remercie sincèrement les membres du jury de ma thèse. Merci à chacun de vous pour vos remarques justifiées et vos questions pertinentes. Ce fut un plaisir de vous rencontrer. Que de cette rencontre puisse naître des futures collaborations. Merci à **Xavier Leroux** pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, pour avoir lu si minutieusement mon manuscrit et pour sa sympathie. Merci à **Paul Del Giorgio** d'avoir accepté d'être également rapporteur de ma thèse même si nous n'avons pas pu nous rencontrer. J'ai eu le plaisir de faire la connaissance de **Josep Gasol** qui n'a pas hésité à venir de loin et qui nous a émerveillé par son français quasi parfait. Merci à **Nathalie Fromin** et à **Didier Debroas** que j'ai eu le plaisir de connaître auparavant et qui ont mis du poivre dans ma soutenance.

Un grand merci à **Stephan Jacquet** qui bouillonne d'idées et grâce auquel j'ai pu contribuer à différents projets, généralement en coopération avec **Isabelle Domaizon**, un oiseau rare dans le milieu de la recherche pour son allégresse et sa gentillesse. Stephan m'a permis d'acquérir des connaissances en cytométrie en flux et de découvrir encore plus petit que les bactéries : les virus.

Durant ses derniers six ans passés à l'INRA de Thonon j'ai acquis des connaissances qui me sont précieuses et qui font que je suis telle que je suis en science au moins... Les gens



qui ont le plus contribué à ma formation scientifique, sont par ordre alphabétique, pour ne pas faire de jaloux, **Annette Bérard, Jean François Humbert et Christophe Leboulanger**. Que dire de toi Annette ? Tu incarnes la motivation et la passion pour la recherche, tu es si généreuse à tout point de vue et tu m'a été une conseillère précieuse au cours de ces nombreuses années, je te suis redevable. Jean-François tu m'as formé à la biologie moléculaire et tu m'as responsabilisé. Christophe, tu as encadré ma « tesi ottimale », tes connaissances m'ont été souvent précieuses.

Mes remerciement vont aussi à toute l'équipe de microbiologie aquatique dont je fais partie et à toutes les personnes de la station INRA et d'ailleurs qui ont largement contribué au bon déroulement de cette thèse. Je pense tout particulièrement à **Pascal Perney**, le dernier arrivé à la station qui a assuré de façon étonnante une multitude de tâches diverses, de l'échantillonnage à l'analyse de la production et activité bactérienne. Merci à **Brigitte Le Berre** pour sa présence au laboratoire de biologie moléculaire et d'avoir assuré parfois l'échantillonnage sur les trois lacs, avec **Pascal Perney, Pascal Chifflet, Jean-Christophe Hustache et Gérard Paolini**. Merci à **Raymonde Chandevaut** pour sa gentillesse incroyable et son aide plus que précieuse en laverie. Nous te regrettons vraiment. Merci à **Eliane Menthon** pour ses conseils en algorithme et merci à **Marie-Hélène Gourdon** pour ses conseils en biologie moléculaire et son écoute. Merci à l'équipe de chimie, en particulier merci à **Jérôme Lazzarotto et Jean-Pierre Bosse**.

Je tiens à exprimer mes remerciements à l'équipe catalane rencontré lors de ma première année de thèse et qui ont plus que largement contribué à me former. Les enseignements reçus en peu de temps ont été précieux. Merci à **Carlos Pedros Alio** de m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Ciències del Mar de Barcelona, merci à **Laure Guillou** d'avoir organisé cela. Je ne pourrais jamais oublier la gentillesse et le savoir faire de **Vanessa Balagué** qui a su me montrer une variété de techniques (muchas gracias a tigo !).

Merci à tous les stagiaires qui ont fourni un très bon travail. Je pense tout particulièrement à **Sonia Bonifacio** en qui j'ai trouvé en plus une bonne camarade, à **Mathieu Kopec, Vinciane Lestavel, Lucie Vindigni, Pierre-Yves Peseux et Manuela Fouqueray**.

Mes remerciements s'adressent également à **Laurence Volatier**. Merci pour ce temps magnifique que nous avons passé à l'INRA où nous partagions un vrai esprit d'équipe et d'amitié.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers les personnes qui ont eu la patience et la sympathie de lire les versions intermédiaires de mon manuscrit de thèse. Merci à **Annette Bérard** d'avoir pris le temps et pour tes annotations très humoristiques (je ne dirai pas plus), merci à **Laurence Volatier** pour avoir sauté dans ta voiture et venir m'aider lors d'une fin de semaine et pour tes enseignements en grammaire. Merci tout particulièrement à **Stephan Jacquet** qui a lu de façon très consciencieuse toute la version finale de mon manuscrit. Merci également à **Aurèlie Villeneuve** et **Agnès Bouchez** pour votre soutien de dernière minute.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des secrétaires, à **Gislaine Monet**, aide précieuse en informatique et conseillère tout faire et à **Véronique Mottin**, présence incontournable en bibliothèque. Au cours de ses dernières années j'ai pu passer de bons moments de rigolade avec vous !

Merci à l'équipe « bâresque » qui va m'accueillir en postdoc et avec laquelle j'ai déjà partagé des bons moments. Merci à **Bernard Montuelle**, **Bernadette Volat**, **Jean Claude Boisson**, **Jean-Louis Roullier** et **Bernard Motte**. J'espère que notre collaboration sera agréable et profitable à nous tous !

Je ne pourrais pas ne pas remercier mon « pote » de bureau et de cuisine à midi, **Sébastien Personnic** qui a su écouter avec patience toutes mes histoires personnelles et qui a du partager mes hauts et mes bas (une vrai montagne russe parfois). Je n'oublierai pas les sketches de Samantha qui nous ont bien fait rigolé, n'est-ce pas ? Nous allons non plus oublier l'odeur agréable de notre bureau, témoin de café renversé et de chocolat oublié !

Merci également à toutes les personnes qui m'ont offert leur amitié et qui m'ont soutenu de près et de loin, dans le passé et encore maintenant. I miei amici di sempre siete voi : **Marta** (la ciccìa Cattai), **Varenka** (la ciccìa « Varech ») e **Christian** (detto « il corto »). Vi adoro ! Merci à la chaîne de l'amitié **Annette** et **Laurence** pour leur omni-présence au cours des dernières années. Nous avons partagé de bons moments n'est-ce pas ? Mais également des moins biens et c'est ça qui est bien. Merci à mon amie d'Haute Savoie,

**Nathalie** de m'avoir entraîné en jogging et pour sa compagnie « nature » en rock et en espagnol ! Tu as toujours été là quand il fallait ! Merci d'exister à **Fred** (dit « le skieur pro ») et à mon breton préféré, **Yannick**. Même dans les pires moments on a su bien rigoler grâce à votre humour parigo-anglais ! Merci à **Sindy** et **Olivier, Florence, Sylvain, Alexandre SaintO** que je regrette de pas voir plus souvent ! Merci pour des souvenirs impérissables et de tant de moments partagés à **Tati** que je regrette de ne pas avoir près de moi et à **Laure** qui n'hésite pas de sauter dans le train pour venir nous voir dans sa deuxième patrie (la Haute Savoie). Merci « **Teignou** » pour nos ballades en montagnes et pour ta compagnie. Merci **Raphaël** de m'avoir initié à l'« oiseau-culture » et d'avoir amené un certain nombre d'amis avec toi à la pêche à 4h du matin ! Merci aux souvenirs de ski et autre laissé par **Marie, Alex EDF** et **Alex Teuh**. Je n'oublie pas le « za-zen » **Jérôme** et la « grande » tata **Leslie**, les soirées passées ensemble avec **Orlane**, la danseuse, Aura, la gentille et belle, la fourchette-gourmande **André**, le « moi tout va extra bien et toi, raconte ? »-**Sébastien** et sa femme la plus belle du monde **Aurélie**, mon comédien préféré malgré lui **Christophe** (le Totophe) qui a été également mon camarade de café, de dîners, de jogging et de vélo. Merci aux soirées sympa avec **Stephan** et à la trop bonne cuisine et la trop belle décoration de **Carol**. Merci **Agnès**, nos moments de co-voiturage sont très « détente » ! Merci à mes « nouveau » copains, la belle et formidable sainte **Sophie** avec le « sky-diver » **Philippe** (dit le « paque-bot ») et « tout-eu la famill-eu », merci aux bordelais **Thibaut** (« dit la Taupe ») et à la **Mathildou**, merci aux blagues made by **Miriam** et aux apéros avec **Céline, Cécile et Eric, Manu, Anna et Fred, Alexandra**. Merci à **Seb** et **Céline** pour leur accueil toujours chaleureux et leurs apéros improvisés. Grazie ai miei suoceri **David** e **Nicole**. Une pensée affectueuse va à ma copine de yoga **Monique**. Merci enfin à **Fabrice, Muriel, Adrien et Morgan** de m'avoir accueilli en famille à Tahiti et lors de nos vacances « frenchouille ».

Si j'ai fait cette thèse cela tient en partie aussi à **Mylène** qui a été une grande sœur pour moi et avec la quelle j'ai partagé des moments impérissables. Que des rires fous ! Gentille, généreuse, aux yeux brillants. Comme le tournesol que tu as si aimé tourne avec le soleil, j'ai tourné la tête pour te voir toujours. Merci à ta maman **Jocelyne** d'être toujours présente dans ma vie. Je pense avec beaucoup d'affection à ta famille.

J'exprime mes remerciements à **ma sœur Kathrin** et à **mes parents Anna et Manfred** (Manni) qui m'ont toujours aimé, toujours écouté et qui m'ont toujours, s'il le fallait, réconforté. Votre présence m'est indispensable. Mon seul regret est de ne pas habité

plus proche de vous. Merci également à **ma grand-mère Lina** qui malgré son age avancé reste une vrai jeunette. Merci à **ma tante Irmgard** qui a su accueillir avec une grande ouverture d'esprit ma petite nouvelle famille. Merci à **zio Luigi** detto Robert.

Enfin, je dédie ce travail de thèse à toi **Olivier**, le « papa disco ». Sportif et bon papa. Tu as su être patient et gentil et attendre que je sois « al dente ». Ces deux ans passé avec toi m'ont beaucoup appris sur la vie à deux, et même sur la vie à quatre. J'espère pouvoir partager encore beaucoup de moments ensemble avec toi, la petite doudoune fofolle **Agathe** et la grande talentueuse **Manon**. Que nos projets se réalisent enfin !



---

## RESUME

Face à la dégradation des écosystèmes, associée à une modification de la structure des communautés, voir à une disparition accrues de certaines espèces, les enjeux majeurs de ce siècle sont d'étudier la biodiversité et les facteurs pouvant interagir sur celle-ci, et d'étudier le rôle fonctionnel de cette biodiversité. Dans ce contexte, il s'est agit pour moi d'étudier la composition et la diversité de communautés eubactériennes et de cyanophages dans des écosystèmes pélagiques des grands lacs Alpains français, ayant subi des pressions anthropiques plus ou moins intenses. Ainsi, nous avons mené trois études dans trois lacs de statuts trophiques différents : le lac d'Annecy est oligotrophe et peut être considéré comme système de référence, alors que les deux autres lacs, le Bourget et le Léman sont mésotrophes. Le lac du Bourget se distingue des deux autres par la présence régulière et massive d'une cyanobactérie filamenteuse toxique, *Planktothrix rubescens*, qui prolifère dans ses eaux depuis 1998. Sur un plan méthodologique, l'étude de la composition de la communauté eubactérienne et cyanophage a été réalisée au moyen de la technique de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), alors que la technique de clonage-séquençage a été utilisée afin de pouvoir identifier les groupes taxonomiques et d'inférer des relations phylogénétiques.

De la première étude il apparaît que l'essentiel de la variabilité de la composition eubactérienne du lac du Bourget se situe sur une échelle verticale plutôt qu'horizontale lorsque le lac est thermiquement stratifié. Cette variabilité verticale reflète la présence de couches thermiques différentes et des micro-couches chimiques (notamment liées aux phosphates), favorisant l'établissement de communautés différenciellement adaptées aux conditions qu'elles rencontrent. Pendant la période de brassage des eaux (hiver), la composition de la communauté est homogène sur l'ensemble de la masse d'eau. L'influence des tributaires sur la composition eubactérienne se restreint à la zone d'embouchure. D'un point de vue méthodologique, ces résultats suggèrent qu'à condition d'éviter le littoral et d'autres zones isolées, un nombre restreint d'échantillons pourrait être suffisant pour décrire de façon représentative la composition de la communauté eubactérienne dans un grand lac.

La deuxième étude montre tout d'abord que les trois lacs possédaient des communautés eubactériennes caractéristiques des écosystèmes lacustres, avec une diversité relativement faible. Les *Actinobactéries* constituent le groupe dominant au sein de ces communautés. Nous avons également montré l'absence de changements majeurs dans la composition selon les saisons, l'origine géographique ou la profondeur. Des changements dus

à des pressions locales peuvent intervenir sur une faible proportion de la masse d'eau et sporadiquement : au niveau de l'épilimnion au printemps et en été lorsque les biomasses phytoplanctoniques sont importantes. Il est probable que la forte ressemblance entre les communautés eubactériennes de ces trois lacs, en dépit d'états trophiques différents, soit due à leur grand volume : l'hypolimnion présente une part très importante de ces lacs ; ici des nombreux processus et facteurs environnementaux sont communs aux trois lacs. Ce sont donc des pressions régionales qui ont une influence sur la composition des communautés eubactériennes des trois grands lacs Alpains français.

La troisième étude, a mis en évidence une diversité de cyanophages du lac du Bourget relativement grande. La composition de cette communauté subit des changements saisonniers qui sont liés indirectement ou directement à la température et à la chlorophylle *a*. L'analyse de la dynamique des différents composants microbiens montre également que les séquences de cyanophages obtenues semblent plus probablement provenir de cyanophages parasites de picocyanobactéries que de « microcyanobactéries » comme *P. rubescens*.

Mots clefs : biodiversité, eubactéries, cyanophages, origine de la diversité microbienne, facteurs de structuration de la composition de la communauté, grands lacs.

## ABSTRACT

Considering the degradation of the ecosystems together with a modification of the structure of the communities, and sometimes an increased disappearance of some species, the major stakes of this century are to study the biodiversity and the factors interacting with biodiversity, and finally to study the functional role of this biodiversity. In the framework of this global context, this thesis aimed at studying the composition and diversity of eubacterial and cyanophage communities within the pelagic region of several French great Alpine lakes, which are submitted to different anthropogenic pressures. Three research studies have been undertaken within three lakes differing in their trophic state: lake Annecy is oligotrophic and may be considered as the reference site, whereas lake Bourget and lake Geneva are mesotrophic. Another difference is given by the regular and strong presence of a toxic and filamentous cyanobacteria, *Planktothrix rubescens*, which proliferate in lake Bourget since 1998. From a methodological point of view, we studied the eubacterial and cyanophage composition by means of the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), whereas the cloning-sequencing technique was used to identify the taxonomic groups present and to infer phylogenetic relationships.

From the first study, it appears, that the essential of the variation of the eubacterial composition in lake Bourget, is situated on a vertical scale rather than on a horizontal scale when the lake is stratified. This vertical variability reflects the presence of different temperature layers and of different chemical micro-layers (in particular phosphate) favoring the establishment of communities differently adapted to the conditions they encounter. During the mixing period (winter), the composition of the community is homogeneous within the whole water mass. The influence of the tributaries on the eubacterial composition is restricted to the mouth of the tributaries. From a practical point of view, these results suggest that, a small number of samples may be sufficient to provide a reliable and representative idea of the eubacterial community composition in a great lake, as long as the samples are not taken within isolated areas of the lake or near the borders of the lake.

The second study provided evidence that the three lakes investigated, harbor typical lake eubacterial communities which are characterized by a weak global diversity. The *Actinobacteria* are the dominant taxonomic group within those communities. We have also shown, that no major differences occur according to the season, the geographical origin and the depth. Variation due to local pressures may act on a small proportion of the water mass



and only sporadically : within the epilimnion in spring and in summer, when phytoplankton biomasses are important. It is likely that the strong resemblance among the eubacterial communities of the three lakes, despite differences in their trophic state, are due to the important volume of these lakes : the hypolimnion represents a great part of those lakes; within this part a great number of different environmental factors and processes are shared. We conclude that the regional pressures may have a strong influence on the eubacterial community composition within the three great French Alpine lakes.

The third study has shown that the cyanophage diversity is relatively great. The cyanophage community composition is submitted to seasonal changes which are directly or indirectly linked to the temperature and the chlorophyll *a*. The analysis of the dynamics of the different microbial communities shows that the cyanophage sequences we obtained, are likely to originate from viruses infecting picocyanobacteria rather than microcyanobacteria such as *P. rubescens*.

# SOMMAIRE

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| Sommaire.....                  | i   |
| La liste des abréviations..... | ii  |
| La liste de figures.....       | iii |
| La liste des tableaux.....     | iv  |
| La liste des articles.....     | v   |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1. Contexte scientifique général.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Contexte scientifique local.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1. L'équipe « Microbiologie Aquatique » de la station d'hydrobiologie<br/>            lacustre INRA de Thonon-les-Bains.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.2. Objectifs majeurs de la thèse.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.3. Pourquoi avoir choisi les lacs d'Annecy, Bourget et Léman comme sites<br/>            d'études ?.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>2.4. Des questions plus précises.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>3. Structure du document.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>CHAPITRE I : Biodiversité : modèles, rôle et techniques d'analyse.....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1. Biodiversité et diversité.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>2. Bactéries et bactériophages, deux modèles d'études pour appréhender l'origine<br/>        de la biodiversité et son rôle dans le fonctionnement des écosystèmes.....</b> | <b>11</b> |
| <b>2.1. Les bactéries et plus particulièrement les eubactéries.....</b>  | <b>11</b> |
| 2.1.1. Taille, forme, organisation cellulaire.....   | 12        |
| 2.1.2. Reproduction et échanges de matériel génétique.....   | 13        |
| 2.1.3. Ubiquité et nombre total de bactéries sur Terre.....  | 13        |
| 2.1.4. Abondance bactérienne en milieu aquatique et facteurs de régulation de<br>celle-ci.....   | 14        |
| 2.1.5. Les bactéries aquatiques fixées et libres : deux communautés<br>différentes ?.....  | 15        |
| 2.1.6. Diversité métabolique des bactéries.....  | 16        |
| 2.1.7. Rôle fonctionnel des bactéries.....   | 16        |
| 2.1.8. Diversité taxonomique des bactéries.....  | 17        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.8.1. Les techniques basées sur la mise en culture.....  | 17        |
| 2.1.8.2. Les techniques biomoléculaires.....  | 19        |
| 2.1.8.3. Espèce égale à OTU ?.....  | 24        |
| 2.1.9. L'origine de la diversité bactérienne.....   | 24        |
| 2.1.9.1. Influence relative des facteurs biotiques et abiotiques sur la diversité<br>bactérienne.....                                 | 25        |
| 2.1.9.1.1. L'influence des facteurs physico-chimiques.....  | 25        |
| 2.1.9.1.2. L'influence des facteurs de contrôle biotique.....   | 27        |
| 2.1.9.1.3. L'influence de deux variables complexes : l'espace et le<br>temps.....   | 28        |
| 2.1.9.1.4. L'influence de l'hétérogénéité micro-environnementale.....   | 29        |
| 2.1.9.1.5. L'influence des perturbations.....   | 30        |
| 2.1.9.2. Les mécanismes influant la composition de la communauté<br>bactérienne à l'échelle locale et régionale.....                  | 31        |
| 2.1.9.2.1. Le concept d'ubiquité.....   | 31        |
| 2.1.9.2.2. Le concept de métacommunauté.....  | 33        |
| <b>2.2. Les virus et les bactériophages en particulier.....</b>   | <b>34</b> |
| 2.2.1. Taille, organisation structurale et forme.....   | 35        |
| 2.2.2. Modes de reproduction des bactériophages.....  | 37        |
| 2.2.3. Ubiquité et nombre total de virus sur Terre.....   | 38        |
| 2.2.4. Abondance en milieu aquatique et facteurs de régulation.....   | 39        |
| 2.2.5. Rôle fonctionnel des bactériophages en milieu aquatique.....   | 41        |
| 2.2.5.1. Flux de matière.....   | 41        |
| 2.2.5.2. Contrôle des populations hôtes.....  | 42        |
| 2.2.5.3. Contrôle des populations de cyanophages ou d'autres espèces<br>phytoplanctonique impliquées dans la formation de blooms..... | 43        |
| 2.2.6. Diversité taxinomique des bactériophages .....   | 44        |
| 2.2.6.1. Les techniques basées sur la mise en culture.....  | 44        |
| 2.2.6.2. Les techniques biomoléculaires.....  | 44        |
| 2.2.6.3. Deux systèmes de classifications, deux notions d'espèces ?.....  | 46        |
| 2.2.7. Origine de la diversité virale.....  | 47        |
| 2.2.7.1. Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la diversité virale<br>.....  | 47        |

|  |     |
|--|-----|
| 2.2.7.2. Les mécanismes influant la composition de la communauté virale à l'échelle locale et régionale..... | 49  |
| 2.2.7.2.1. Biogéographie ou ubiquité ?.....  | 49  |
| 2.2.7.2.2. Le modèle de Bank.....  | 50  |
| 3. <b>Approches moléculaires pour déterminer la diversité des communautés microbiennes aquatiques :</b>      |     |
| <b>ARTICLE I</b> .....   | 51  |
| <b>CHAPITRE II : Conception des travaux et sites d'études</b> .....  | 65  |
| 1. <b>Comment répondre aux objectifs de la thèse</b> .....   | 65  |
| 2. <b>Présentation des sites d'études</b> .....  | 67  |
| <b>2.1. Le lac d'Annecy</b> .....  | 69  |
| 2.1.1. Caractéristiques.....   | 69  |
| 2.1.2. Historique.....   | 69  |
| 2.1.3. Echantillonnage.....  | 69  |
| <b>2.2. Le lac du Bourget</b> .....  | 70  |
| 2.2.1. Caractéristiques.....   | 70  |
| 2.2.2. Historique.....   | 70  |
| 2.1.3. Echantillonnage.....  | 70  |
| <b>2.3. Le lac Léman</b> .....   | 71  |
| 2.3.1. Caractéristiques.....   | 71  |
| 2.3.2. Historique.....   | 71  |
| 2.3.3. Echantillonnage.....  | 71  |
| <b>CHAPITRE III : Résultats relatifs aux travaux expérimentaux</b> .....                                     | 73  |
| 1. <b>ARTICLE II résumé en français</b> .....  | 74  |
| 1.1. Contexte de l'étude.....  | 74  |
| 1.2. L'étude réalisée.....   | 74  |
| 1.3. La variabilité spatiale de la composition eubactérienne dans le lac du Bourget.....                     | 74  |
| <b>ARTICLE II en anglais</b> .....   | 79  |
| 2. <b>ARTICLE III résumé en français</b> .....   | 105 |
| 2.1. Contexte de l'étude.....  | 105 |
| 2.2. L'étude réalisée.....   | 105 |
| 2.3. Quelles sont les grands groupes taxonomiques ? .....  | 105 |
| 2.4. Homologie et origine des séquences trouvées.....  | 106 |

|   |            |
|---|------------|
| ARTICLE III en anglais.....   | 111        |
| <b>3. ARTICLE IV résumé en français .....</b>   | <b>153</b> |
| <b>3.1. Contexte de l'étude.....</b>  | <b>153</b> |
| <b>3.2. L'étude réalisée.....</b>   | <b>153</b> |
| <b>3.3. Composition et diversité virale.....</b>                                      | <b>154</b> |
| ARTICLE IV et article en anglais.....   | 157        |
| <b>CHAPITRE IV : Discussion.....</b>  | <b>163</b> |
| <b>1. Variabilité spatiale de la composition eubactérienne pélagique dans les</b>     |            |
| <b>écosystèmes lacustres étudiés.....</b>   | <b>163</b> |
| <b>2. La représentativité d'un échantillon dans un grand lac.....</b>                 | <b>168</b> |
| <b>3. Variabilité temporelle de la diversité.....</b>                                 | <b>169</b> |
| <b>3.1. La variabilité saisonnière de la composition des communautés</b>              |            |
| <b>eubactériennes pélagiques dans les trois lacs.....</b>                             | <b>170</b> |
| <b>3.2. La variabilité saisonnière des communautés de cyanophages en zone</b>         |            |
| <b>pélagique dans le lac du Bourget.....</b>  | <b>172</b> |
| <b>4. Quelle est la composition des communautés eubactériennes et cyanophages</b>     |            |
| <b>dans les lacs subalpins étudiés ? .....</b>  | <b>173</b> |
| <b>3.1. Analyse taxinomique de la communauté eubactérienne.....</b>                   | <b>173</b> |
| <b>3.2. Analyse taxinomique de la communauté de cyanophages .....</b>                 | <b>176</b> |
| <b>5. Les facteurs pouvant influencer la diversité des communautés</b>                |            |
| <b>microbiennes.....</b>  | <b>177</b> |
| <b>5.1. Profondeur, saison ou état trophique.....</b>                                 |            |
| <b>5.2. Influence de bactéries allochtones sur la composition bactérienne</b>         |            |
| <b>lacustre.....</b>  | <b>178</b> |
| <b>5.3. Influence locale ou régionale ? .....</b>                                     | <b>179</b> |
| <b>CHAPITRE V : Conclusions générales et perspectives.....</b>                        | <b>181</b> |
| <b>1. Conclusions générales.....</b>  | <b>181</b> |
| <b>2. Perspectives.....</b>   | <b>183</b> |
| <b>2.1. Réflexions sur les perspectives techniques.....</b>                           | <b>183</b> |
| <b>2.1.1. Autres techniques d'empreinte génétique.....</b>                            | <b>184</b> |
| <b>2.1.2. Comment mesurer la diversité fonctionnelle et la coupler à la diversité</b> |            |
| <b>taxinomique ? .....</b>  | <b>185</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2.2. Perspectives de recherche concernant l'analyse des facteurs et processus structurant la diversité bactérienne et virale.....</b>  | <b>189</b> |
| 2.2.1. Validation des résultats sur la composition eubactérienne par une étude pluriannuelle sur les fractions de bactéries libres et fixées.....   | 189        |
| 2.2.2. Le rayonnement UV et la turbulence peuvent-ils influencer la diversité bactérienne ? .....   | 190        |
| 2.2.3. Diversité bactérienne et virale au cours des proliférations de <i>P. rubescens</i> .....   | 191        |
| 2.2.4. Analyse métagénomique d'ADN virale dans des écosystèmes d'eau douce.....   | 193        |
| <b>2.3. Perspectives concernant les relations biodiversité et fonctionnement/stabilité d'un écosystème.....</b>   | <b>193</b> |
| 2.3.1. Analyse métagénomique d'ADN procaryotique (eubactéries et <i>Archaea</i> ) dans un des trois lacs étudiés (Bourget, Annecy ou Léman).....  | 193        |
| 2.3.2. Etudier la distribution spatio-temporelle des gènes impliqués dans le cycle de l'azote (ou de carbone) dans un milieu aquatique et quantifier les impacts de divers perturbations sur leur fonctionnement..... | 194        |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>197</b> |
| <b>ANNEXES DES PROTOCOLES.....</b>  | <b>243</b> |
| <b>Annexe I : Echantillonnage et traitement de l'eau récoltée.....</b>  | <b>245</b> |
| <b>Annexe II : Extraction et purifications de l'ADN eubactérien.....</b>  | <b>247</b> |
| <b>Annexe III : Précipitation et solubilisation de l'ADN.....</b>   | <b>249</b> |
| <b>Annexe IV : Dosage de la quantité d'ADN eubactériens par spectrométrie.....</b>  | <b>251</b> |
| <b>Annexe V : Amplification par PCR.....</b>  | <b>253</b> |
| <b>Annexe VI : Electrophorèse en gel d'agarose.....</b>   | <b>257</b> |
| <b>Annexe VII : La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....</b>  | <b>259</b> |
| <b>Annexe VIII : La technique de clonage.....</b>   | <b>271</b> |
| <b>Annexe IX : La technique de séquençage.....</b>  | <b>275</b> |
| <b>Annexe X : Comptage de bactéries hétérotrophes et de virus par cytométrie en flux.....</b>   | <b>281</b> |
| <b>Annexe XI : Préparation des produits utilisées.....</b>  | <b>285</b> |

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| <b>ARTICLE V</b> .....                | 293 |
| <b>ARTICLE VI</b> .....               | 303 |
| <b>GLOSSAIRE</b> .....                | 337 |
| <b>Publications de l’auteur</b> ..... | 343 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

**A** : Adénosine  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADNr** : AND codant pour l'ARN ribosomal  
**ADNr 16S** : ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal  
**APS** : Ammonium Persulfate  
**ARISA** : Automated ribosomal intergenic spacer analysis  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**BSA** : Bovine Serum Albumine  
**C** : carbone (un élément)  
**C** : Cytosine (un nucléotide)  
**C-F-B** : *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides*  
**CMF** : cytométrie en flux  
**COD** : carbone organique dissout  
**DAPI** : 4,6-diamino-2-phénylindole  
**DGGE** : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
**DNTP** : Deoxynucléotide triphosphate  
**DR** : directeur de recherche  
**EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic acid  
**FISH** : Fluorescence In Situ Hybridization  
**G** : Guanidine  
**g** : unité d'accélération  
**GBL** : gel loading buffer  
**h** : heure  
**IPTG** : Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside  
**Kpb** : Kilo paires de bases  
**L** : litre  
**Min** : minute  
**MOD** : Matière organique dissoute  
**N** : azote  
**NCBI** : National Center for Biotechnology  
**ng** : nanogramme  
**nm** : nanomètre  
**OTU** : Operational Taxonomic Unit  
**P** : phosphore  
**PAR** : Photosynthetically Active Radiation  
**pb** : paire de base  
**PCR** : Polymerase chain reaction  
**PFGE** : Pulsed-Field Gel Electrophoresis  
**Prof.** : Professeur  
**RDPII** : Ribosomal Database Project II  
**RFLP** : Restriction Length Fragment Polymorphism  
**RISA** : Ribosomal intergenic spacer analysis  
**RT-PCR** : Real-Time PCR  
**RPM** : Rotation par minute  
**S** : Svedberg  
**SDS** : Sodium dodecyl sulfate



**Sec**: seconde

**SIP** : Stable Isotope Probing

**SSCP** : Single Stranded Conformation Polymorphism

**TGGE** : Temperature Gradient Gel Electrophoresis

**T** : thymidine

**TAE** : Tris/Ammonium/EDTA

**TBE** : Tris/Borate/EDTA

**TE** : Tris/EDTA

**TEMED** : N, N, N', N' Tétraméthyléthylénédiamine

**T<sub>m</sub>** : Température de fusion (angl. : melting temperature) est la valeur médiane du profil thermique de dénaturation d'un duplex ADN/ADN ou ADN/ARN

**ΔT<sub>m</sub>** : la différence de T<sub>m</sub> entre l'hybride homologue et hétérologue

**T-RFLP** : Terminal Restriction Length Fragment Polymorphism

**UV-UVB** : ultra violet, ultra violet de type B

**qsp** : quantité suffisante pour

**X-Gal** : 5-bromo-4-chloro-3 indolyl-β-D-galactopyranoside

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I :

**Fig. 1.** A gauche une bactérie en forme de coque (*Staphylococcus aureus*, X 32.000), à droite une à bâtonnet (*Clostridium perfringens*, X 800). D'après Prescott et al. (1996).

**Fig.2.** Nombre de séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S publiées dans la banque mondiale GenBank (ordonnée) en fonction de l'année (abscisse). Toutes les séquences publiées avant 1993 sont regroupées dans la première colonne (< 1993). A gauche : le nombre de séquences relatives à des bactéries cultivées (*Archaea* et *Eubacteria*) contre le nombre de séquences en provenance d'études non basées sur des méthodes de mise en culture (clones environnementaux), en fonction de l'année. A droite : nombre total de séquences de clones environnementaux en provenance d'échantillons du sédiment, du sol, des eaux douces et marines. D'après Rappé et Giovannoni (2003).

**Fig.3.** Arbre phylogénétique basées sur 46 séquences représentatives de tous les groupes phylogénétiques. D'après Pace (1997).

**Fig.4.** Arbre phylogénétique d'après Rappé et Giovannoni (2003). En noir les phyla décrit par Woese (1987), en blanc les phyla pour lesquelles des représentants cultivés existent et en gris 26 phyla candidates.

**Fig.5.** Distribution des groupes taxonomiques microbiens en eau douce ou salée, en milieu pélagique ou benthique. Les cercles représentent des agrégats/particules/d'autres organismes sur lesquels se trouvent les bactéries fixées. D'après Nold et Zwart (1998).

**Fig.6.** La composition de la communauté et la dynamique des populations sont influencées d'une part par des processus locaux (*ex.* : conditions environnementales) et des processus régionaux (*ex.* : appelé la métacommunauté), et déterminent le fonctionnement de communautés locales, ainsi que de l'écosystème. D'après Langenheder (2005).

**Fig.7.** Photos de bactériophages ; au centre des bactériophages entourant une cellule d'*Escherichia coli*. L'échelle correspond à 100 nm. Extrait de Bruessow et Hendrix (2002).

**Fig. 8.** Représentation schématique des groupes majeurs de phages. D'après Ackermann, (2003). Consulter Tab. 2. pour les codes d'identifications.

**Fig.9.** Représentation schématique des principaux types de cycles de vie de virus, et notamment des bactériophages. Image d'après Weinbauer (2004).

**Fig.10.** Boucle microbienne et effets des virus (« lysis »). Voir texte pour plus de détails. D'après Bratbak, (1994).

**Fig.11.** Modèle de Bank ; la distribution de génotypes viraux en abscisse et leur abondance relative en ordonné (rang-abondance) dans une communauté. Voir texte pour plus de détails. D'après Breitbart et Rohwer (2005).

## Chapitre II :

**Fig.12.** Localisation des lacs d'Annecy, du Bourget et Léman dans la Région Rhône-Alpes. Source Intercarto 2001.

**Fig.13.** Le lac d'Annecy, montrant les deux bassins, le grand et le petit lac. Les étoiles symbolisent les sites de références de chaque bassin. Nos échantillons proviennent tous du site de référence du grand lac.

**Fig.14.** Le lac du Bourget. Le point « B » symbolise le site de référence.

**Fig. 15.** La carte bathymétrique du lac Léman. La station « SHL2» est notre site de référence.

## Chapitre III :

**Fig. 16.** Profils de DGGE de 10 échantillons prélevés en janvier à différentes profondeurs et en différents points du lac.

**Fig.17.** Image du gel de DGGE relatif à l'amplification en PCR de certains des échantillons prélevés en juin. 1 : B 0 m; 2, B 2 m ; 3, B 30 m; 4 : B 50 m; 5 : B10 m; 6 : B20 m; 7 : B1 15 m; 8 : B2 15 m et 9 : B 15 m. Les profils 1, 2, 5 et 6 correspondent à des prélèvements dans l'épilimnion ; les profils 7, 8 et 9 au métalimnion et les profils 3 et 4 à l'hypolimnion.

**Fig. 18A, B, C.** Les proportions relatives des séquences eubactériennes appartenant au groupe I et IV des Actinobactéries (ACTINO I et IV), aux  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -Protéobactéries (ALPHA-, BETA- et GAMMA-P), C-F-B et à d'autres groupes mineures, fonction du lac d'origine (A), de la profondeur (B) et de la saison (C).

**Fig.19.** Analyse de « cluster » de la similarité des profils de DGGE à différentes saisons (W: hiver, Sp: printemps, Su: été) et à 2 et 50 m pour les lacs d'Annecy (A), du Bourget (B) et le Léman (G).

**Fig.20.** Distribution des 6 clusters de cyanophages identifiés dans le lac du Bourget en fonction des dates de prélèvements.

**Fig.21.** Profils de migration en DGGE sur les produits d'amplification obtenus en septembre (B), octobre (C), novembre (D), décembre (E), janvier (F) et dans un mélange septembre-octobre (A et G). Les flèches indiquent les modifications les plus importantes dans ces profils.

## Chapitre V :

**Fig.22.** Construction et criblage de banques de clones métagénomiques. Représentation schématique relative à la construction de banques de clones à partir d'échantillons environnementaux. D'après Handelsman (2004).

**Annexes :**

**Fig. 23.** Photo du système d'écoulement

**Fig. 24 A, B, C et D.** Photos de quelques étapes en DGGE



---

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre I :

**Tab. 1.** Nombre total de cellules procaryotiques dans divers habitats. D'après Whitman et al. (1998).

**Tab.2.** Classification et caractéristiques basiques des bactériophages. C : circulaire ; L : linéaire, S : segmenté ; T : superhélicoïdale ; ss : brin d'ADN simple ; ds : double hélice. D'après Ackermann, (2003).

### Chapitre II :

**Tab.3.** Récapitulatif des points et de la période de prélèvements d'eau et techniques utilisées afin d'analyser la diversité bactérienne ou virale dans l'ensemble de mes recherches.

**Tab.4.** Sélection de quelques caractéristiques physico-chimiques et biologiques des lacs étudiés. La gamme de chaque paramètre se réfère à la valeur minimale et maximale enregistrée à une fréquence bimensuelle au cours de l'année 2003 entre 0 et 50 m de profondeur au site de référence.

### Annexes :

**Tab.5.** Exemple de composition du mélange utilisé en PCR pour un échantillon et un volume réactionnel de 50  $\mu$ l (-1 $\mu$ l d'ADN).

**Tab. 6.** Amorces utilisées : P81-P92 pour clonage-séquençage de cyanophages; P94-P92 pour DGGE sur cyanophages; P75-P78 pour clonage-séquençage d'eubactéries ; P78-P79 pour DGGE sur eubactéries. Les chiffres en gras correspondent à nos appellations.

**Tab.7.** Pourcentage d'agarose conseillé pour l'analyse de tailles différentes d'ADN.

**Tab.8.** Composition du mélange pour PCR pour une analyse de diversité eubactérienne en DGGE. Ici les volumes suffisent pour un échantillon.

**Tab. 9.** Composition du mélange pour PCR (mix de 50  $\mu$ l) pour une analyse de diversité des cyanophages en DGGE. Ici les volumes suffisent pour un échantillon.

**Tab. 10.** Caractéristiques des amorces utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité eubactérienne (P78-P79) et de la diversité de cyanophages (P92-P94). Les chiffres en gras correspondent à nos appellations au laboratoire.

**Tab.11** . Caractéristiques du programme utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité eubactérienne.

**Tab.12.** Caractéristiques du programme utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité de cyanophages.

**Tab. 13.** 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.

**Tab. 14.** 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.

**Tab. 15.** Composition d'un gel de 1 mm d'épaisseur et contenant un gradient de 30-70% (analyse de diversité de cyanophages). Le 0% servira à remplir le haut du gel.

**Tab. 16.** Composition du mix de ligation pour un échantillon.

**Tab. 17.** Composition du mix PCR pour un échantillon et un volume réactionnel de 50  $\mu$ l, utilisé pour la PCR sur clone.

**Tab. 18.** Programme PCR utilisé pour amplifier en T7 et SP6 (suite à clonage).

**Tab. 19.** Paramètres mesurés en CMF en fonction des signaux optiques analysés

**Tab. 20.** Classification trophique des lacs selon la teneur des eaux en nutriments (Pourriot et Meybeck, 1995).

## LA LISTE DES ARTICLES

Ce manuscrit de thèse repose sur les cinq articles suivants :

- I Dorigo U., L. Volatier, D. Fontvieille & J.-F. Humbert, 2005. Use of molecular approaches for studying biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research**. 39, 2207-2218.
- II Dorigo U., D. Fontvieille & J.F. Humbert. Spatial variability in the abundance and composition of the bacterioplankton community of the Lac du Bourget (France). **FEMS Microbial Ecology**. Soumis.
- III Dorigo U., D. Fontvieille & J.F. Humbert. Comparative study on the composition of the freshwater eubacterioplankton community in three deep French Alpine lakes of different trophic status. **Limnology and Oceanography**. Soumis.
- IV Dorigo U., S. Jacquet & J.F. Humbert. 2004. Cyanophage Diversity Inferred from g20 Gene Analyses in the Largest Natural French Lake, Lake Bourget. **Applied and Environmental Microbiology** 70, 1017-1022.

Deux articles supplémentaires sont présentés en Annexes. Il s'agit de :

- V Humbert J.F. & U. Dorigo, 2005. Biodiversity and aquatic ecosystem functioning: a minireview. **Aquatic Ecosystem Health and Management** 8 (3) XX-XX
- VI Dorigo, U., S. Personnic & S. Jacquet. Necessary tests for accurate counting of freshwater microbial communities using either flow cytometry or epifluorescence microscopy. **Water Research**. Soumis.

Dans la suite du manuscrit, on fera référence aux articles en indiquant les chiffres romains.





---

## -INTRODUCTION-

### 1. Contexte scientifique général

Au cours de ces dernières années, **une attention croissante de la communauté scientifique s'est portée sur l'étude de la biodiversité et des conséquences écologiques potentielles d'une éventuelle dégradation de celle-ci** par les modifications majeures engendrées tant par les activités anthropiques que par les facteurs naturels, connus sous le terme de « global change » ou « changement global ». Ce sont les changements du climat et de la composition de l'atmosphère mais aussi les changements d'occupation et d'exploitation des terres et des milieux aquatiques (intensification des usages due à l'accroissement, de la déforestation, intensification agricole, raréfaction de la ressource en eau potable...) qui constituent les modifications majeures et qui se mesurent soit localement avec des conséquences mondiales (déboisement, désertification,...), soit mondialement avec des effets locaux et/ou globaux (notamment l'effet de serre renforcé, l'amincissement de la couche d'ozone stratosphérique,...) (Barnett et al., 2001; Levitus et al., 2001; Tilman et al., 2001 ; Meybeck, 2004). Le changement global peut induire des modifications de la biodiversité et celles-ci pourraient ensuite rétroagir sur le fonctionnement des écosystèmes (Horz et al., 2004). Récemment, Thomas et al. (2004) ont estimé qu'avant 2050, il y aura un risque d'extinction d'espèces de l'ordre de 18 et 35%.

**Quant on s'intéresse à la biodiversité, on s'interroge d'une part sur l'origine et sur la conservation de celle-ci, et d'autre part sur ses relations avec le fonctionnement des écosystèmes.** L'intérêt porté à la biodiversité par les scientifiques, le monde médiatique et politique, mais aussi les économistes et les sociologues, s'explique par le fait que celle-ci représente des **enjeux non seulement d'ordre écologique mais aussi d'ordre économique et éthique** (Chapin III et al., 2000 ; Petchey, 2000; Tilman, 2000 ; Smith et al., 2003 ). En effet, d'un point de vue écologique la biodiversité joue un rôle majeur dans le maintien des processus d'évolution du monde vivant, dans la régulation des équilibres physico-chimiques de la biosphère (cycles du carbone, de l'oxygène, de l'eau...) et dans les capacités des êtres vivants à absorber et décomposer des polluants organiques et minéraux au sein de cette biosphère (Lettinga, 1995; Mohn, 1995 ). La biodiversité est aussi un enjeu économique par le

fait que la diversité des espèces, des écosystèmes et des habitats influencent la productivité et la capacité de ces écosystèmes à maintenir la fertilité (en particulier celle des sols) ou encore à assainir des milieux pollués (en particulier l'eau). Les industries pharmaceutiques, alimentaires et le tourisme tirent également avantage de la biodiversité (*ex.* : (Jiang et Xu, 1996)). Enfin, la gestion et la conservation de la biodiversité sont aussi une question d'éthique (religieuse, morale et culturelle) (Chapin III et al., 2000 ; Tilman, 2000).

**L'extraordinaire diversité de la vie sur Terre a longtemps fasciné l'homme. Celui-ci n'a pas seulement été intrigué par la grande diversité des êtres vivants mais aussi par leur distribution dans le temps et l'espace.** Dans un premier temps, les connaissances scientifiques en matière de diversité ont été acquises par le biais d'études effectuées sur les **plantes et les animaux** (Hooper et Vitousek, 1997; Wardle et al., 2000). Par la suite, les organismes de plus petite taille, les **microorganismes** (virus, procaryotes et eucaryotes), ont pu être mis en évidence et être étudiés grâce à l'utilisation du microscope (Hobbie et al., 1977; Torrella et Morita, 1979). Contrairement aux microorganismes eucaryotes, les bactéries et les virus sont restés longtemps peu connus en raison de leur petite taille, de leur grande plasticité morphologique (donc absence de critères phénotypiques clairs) et de la difficulté à les cultiver en laboratoire (Dykhuisen, 1998). Grâce à des techniques de mise en culture plus performantes mais surtout grâce à l'utilisation de techniques biomoléculaires, notre vision de la diversité microbienne dans la quasi totalité des écosystèmes, des fonds marins jusqu'aux glaciers, s'est considérablement améliorée (Amann et al., 1995 ; Hugenholtz et al., 1998; Giovannoni et Rappé, 2000; Wommack et Colwell, 2000; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). Cependant, les études traitant de la diversité microbienne en eau douce restent peu nombreuses par rapport aux études réalisées en milieu terrestre ou marin, comme le montre dans le cas de bactéries, le nombre de séquences codant pour l'ARNr 16S publiées dans la banque de séquences nucléotidique GenBank (Rappé et Giovannoni, 2003). Des travaux de recherche supplémentaires sont donc encore nécessaires pour approfondir nos connaissances relatives à la structure et au fonctionnement des écosystèmes aquatiques mais aussi terrestres.

La **diversité bactérienne** est probablement énorme puisque plusieurs milliards d'espèces bactériennes sont supposées exister (Dykhuisen, 1998). Il est intéressant pour plusieurs raisons de s'intéresser à la diversité bactérienne. En effet, ces organismes, par leur temps de génération court, ont un formidable potentiel adaptatif et constituent donc un modèle

d'étude de choix des processus intervenant sur la création et la conservation de la biodiversité. De plus, les bactéries interviennent dans un très grand nombre de processus environnementaux essentiels à la vie sur Terre, ce qui renforce l'intérêt qu'elles suscitent. Enfin, la diversité bactérienne est également d'une grande importance dans certains domaines de la recherche appliquée tels que la biorémédiation (la dégradation biologique de polluants) (Lettinga, 1995 ; Mohn, 1995 ; Dojka et al., 1998 ; Watanabe et Baker, 2000; Eriksson et al., 2003 ; Pender et al., 2004 ) et la bioprospection (la recherche de nouvelles molécules biochimiques à des fins industrielles et médicales) (Jiang et Xu, 1996 ; Fiedler et al., 2005).

Si nos connaissances sur la diversité bactérienne paraissent encore limitées, celles relatives à la **diversité des virus** le sont encore plus. Pourtant dans les milieux aquatique les virus sont, comme les bactéries, des composants biologiques susceptibles d'influencer les cycles biogéochimiques et écologiques à travers l'infection et la lyse des communautés hôtes intervenant dans le recyclage de la matière organique et de la production primaire (bactéries et microorganismes photosynthétiques, respectivement) (Fuhrman, 1999 ; Wilhelm et Suttle, 1999). De plus, ces particules biologiques peuvent influencer la diversité génétique procaryotique à travers divers processus, tels que la lyse virale de l'hôte spécifique et le transfert de gènes viraux et procaryotiques entre espèces (Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). Enfin, les virus sont probablement les particules biologiques les plus abondantes et les plus diverses sur Terre. Rohwer et Edwards (2002) estime le nombre total de virus sur Terre à  $10^{31}$ . Quant à la diversité, selon Breitbart et Rohwer (2005), la majorité de la diversité génétique virale est pour le moment inconnue, mais elle serait en tout cas supérieure à celle des bactéries.

## **2. Contexte scientifique local**

### **2.1. L'équipe « Microbiologie Aquatique » de la station d'hydrobiologie lacustre INRA de Thonon-les-Bains**

**La station d'hydrobiologie lacustre INRA de Thonon-les-Bains**, située en bordure du lac Léman, s'intéresse depuis sa création au fonctionnement des écosystèmes lacustres, notamment à celui des lacs pré-Alpins et de ses bassins versants d'une part, et d'autre part aux diverses composantes biologiques de ces systèmes. Comme le nom même l'indique, **l'équipe**

**de Microbiologie Aquatique**, au sein de laquelle cette thèse a été menée, se propose d'étudier la dynamique et la diversité des microorganismes des écosystèmes d'eau douce dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de ces milieux. L'équipe a ainsi réalisé des travaux concernant la dynamique et la diversité de microorganismes aquatiques tels que les protistes et les microalgues, les bactéries et les virus (Dorigo et al., 2002 ; Domaizon et al., 2003b ; Comte et al., 2005; Jacquet et al., 2005b). Parmi les travaux concernant la biodiversité et la dynamique des communautés microbiennes d'eau douce, trois thématiques fortes se distinguent et sont abordées par l'équipe. La première concerne les proliférations de cyanobactéries toxiques d'eau douce, et plus particulièrement l'étude de leur dynamique, de leur déterminisme et de leurs conséquences sur le fonctionnement et les usages des écosystèmes (Humbert et Le Berre, 2001 ; Gugger et al., 2005 ; Jacquet et al., 2005a). La deuxième concerne l'impact de xénobiotiques sur la structure et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques et phytobenthiques (Berard et al., 2003 ; Dorigo et al., 2003). Enfin, la troisième se rapporte à l'étude du fonctionnement de la boucle microbienne (Tadonlélé et Sime-Ngando, 2000 ; Domaizon et al., 2003a; Comte et al., 2005 ; Jacquet et al., 2005b ).

## **2.2. Objectifs majeurs de la thèse**

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu m'intéresser à la diversité et à la dynamique des bactéries libres et pélagiques et à la diversité et la dynamique de cyanophages (notamment les cyanomyophages) qui sont un groupe de virus spécifiques des cyanobactéries. Les deux problématiques de recherche de cette thèse s'intègrent donc pleinement dans les problématiques de l'équipe. Ces travaux ont été réalisés en milieu lacustre, plus précisément au sein de trois lacs pré-Alpins, Annecy, Bourget et Léman. Les objectifs majeurs de cette thèse étaient :

- I) de caractériser la diversité microbienne jusqu'ici mal ou pas connue, grâce à des outils issus de la biologie moléculaire ;
- II) de mettre en évidence les facteurs et processus permettant de comprendre les patrons de diversité observés ;

### 2.3. Pourquoi avoir choisi les lacs d'Annecy, du Bourget et le Léman comme sites d'étude ?

La station d'hydrobiologie lacustre de Thonon dispose d'une très longue série de données concernant ces trois lacs au sein de laquelle paradoxalement, peu d'informations sont disponibles sur la diversité microbienne. Or ces trois lacs sont des modèles d'études particulièrement intéressants car ils se distinguent par leur statut trophique résultant d'une pollution plus ou moins importante par les nutriments (phosphore et azote principalement). Ainsi, le lac d'Annecy est oligotrophe et peut être considéré comme système de référence, alors que les deux autres lacs, le Bourget et le Léman sont méso-eutrophe. De plus, dans le Bourget, les proliférations d'une cyanobactérie filamenteuse très toxique, *Planktothrix rubescens*, sont régulièrement observées depuis 1998 (Jacquet et al., 2005a). Si l'on considère la contribution importante de cette cyanobactérie à la biomasse totale lors de son bloom, il est probable que le fonctionnement global du lac du Bourget puisse en être fortement modifié. Plus de détails sur ces trois sites d'études seront donnés en chapitre II.

### 2.4. Des questions plus précises

A partir de ce questionnement très général, nous avons ensuite défini des questions plus précises liées à la fois à l'analyse de la littérature mais aussi aux spécificités des systèmes étudiés. Ces questions sont les suivantes :

- 1) Quelle est la représentativité d'un seul prélèvement lorsque l'on veut évaluer et comparer la diversité d'écosystèmes lacustres de grande taille ?
- 2) Quelle est la variabilité spatiale et temporelle des communautés microbiennes au sein d'un même lac ?
- 3) Quels facteurs et processus physico-chimiques ou biologiques déterminent la diversité bactérienne et virale ?
- 4) Quelle est la part relative des pressions de sélection locales, régionales ou globales dans la structuration des communautés microbiennes ?
- 5) Quel est le rôle de la diversité bactérienne et virale dans le fonctionnement de la boucle microbienne ?
- 6) Quel est le rôle de la diversité bactérienne et virale dans le déterminisme des proliférations de cyanobactéries mais aussi quelles sont les conséquences de ces proliférations sur la composition et le fonctionnement des peuplements microbiens ?

Les ambitions scientifiques affichées à travers ces questions étaient donc vastes mais on constate cependant que notre travail comportait trois parties principales. La première (questions 1 et 2) concernait l'appréhension de la biodiversité elle-même dans des écosystèmes de grandes tailles. La seconde partie (questions 3 et 4) se rapportait à l'identification des processus structurant ces communautés et enfin la troisième (question 5 et 6) avait pour objectif de commencer à s'intéresser aux relations entre biodiversité et fonctionnement. Nous n'avons pu en fait véritablement aborder que les deux premières parties de ce travail et pour ce faire, nous avons développé une étude pluriannuelle en systèmes lacustres au moyen d'outils d'évaluation moléculaires.

### 3. Structure du document

Le présent document se structure en cinq grands chapitres et des Annexes :

- **Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique**, composée de trois parties. Au cours de cette revue bibliographique, nous aborderons dans un premier temps les connaissances disponibles sur les bactéries et les bactériophages en général et en milieu aquatique (leur abondance, rôle, diversité,..). Nous nous attacherons en particulier à la diversité bactérienne et virale, et nous discuterons des facteurs et processus pouvant influencer celle-ci. Puis nous aborderons l'utilisation de diverses approches moléculaires pour évaluer et comparer la biodiversité des communautés microbiennes aquatiques. Cette partie repose sur un article de synthèse (**article I**).
- Le **deuxième chapitre** présente les sites d'études et décrit brièvement les méthodes utilisées.
- Le **troisième chapitre** est dédié aux résultats de nos travaux. Trois articles (articles II, III et IV) soumis ou publiés sont présentés dans cette partie ; chacun est construit selon un schéma traditionnel (résumé, introduction, matériels et méthodes, résultats et discussion) et chacun sera précédé par une partie introductive écrite en français qui contiendra le but de l'étude et une synthèse des

résultats majeurs. Le premier (**article II**) traite de la variabilité spatiale et temporelle de la diversité bactérienne dans le lac du Bourget, le deuxième (**article III**) de la comparaison de la diversité bactérienne des trois lacs et le troisième (**article IV**) de la diversité de cyanophages dans le lac du Bourget.

- Le **quatrième chapitre** est dédié à une discussion générale des résultats présentés dans les trois articles (article II-IV).
- Le **cinquième chapitre** se consacre aux conclusions et aux perspectives de ce travail de recherche.
- En **Annexes**, les lecteurs de ce manuscrit trouveront deux articles supplémentaires préparés au cours de cette thèse. Un premier article de synthèse aborde les relations entre biodiversité et fonctionnement d'un écosystème (article V), alors que le deuxième article porte sur l'optimisation de comptages des cellules bactériennes et virales en eau douce par les techniques de cytométrie en flux et en épifluorescence (article VI). Enfin, des Annexes complémentaires décrivent les principes et protocoles des techniques utilisées.





# -CHAPITRE I- BIODIVERSITÉ : MODÈLES, RÔLE, TECHNIQUES D'ANALYSES

Nous débuterons ce premier chapitre en donnant les définitions se rapportant au concept de biodiversité et à la diversité, qu'elle soit spécifique, génétique, écosystémique ou fonctionnelle. Puis nous dresserons un état des lieux des connaissances sur la biodiversité des communautés microbiennes aquatiques (eubactéries et virus), sur les facteurs et les processus structurant cette biodiversité et en fin sur les relations entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes aquatiques. En fin de chapitre une dernière partie concernera les méthodes biomoléculaires utiles à la détermination de la diversité microbienne en milieu aquatique.

## 1. Biodiversité et diversité

Qu'entendons nous aujourd'hui par **biodiversité** ? Il existe plus d'une centaine de définitions du néologisme « biodiversité » qui a été proposé en 1985 par Walter Rosen, terme qui a ensuite été repris par E. Wilson et M. Peter en 1988. Une des multiples définitions de la biodiversité est celle donnée à la suite de la XVIII<sup>ième</sup> Assemblée Générale de l'Union Internationale de Conservation de la Nature (UICN), réuni au Costa Rica en 1988: « La diversité biologique, ou biodiversité, est définie comme étant la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Ceci inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associées et de leurs interactions, et celle des processus écologiques qu'ils influencent ou dont ils sont les acteurs (dite diversité écosystémique) ». Une autre définition de la diversité est celle donnée par Harper et Howksworth (1995) : « La biodiversité inclut la diversité génétique et écologique sur des échelles spatiales, temporelles et biotiques allant de la cellule jusqu' à l'écosystème ». La biodiversité représente donc la diversité à tout niveau d'organisation.

Depuis l'origine de la Terre, estimée à environ 4,5 milliards d'années, la biodiversité de notre planète n'a pas cessé d'évoluer, du fait d'une perpétuelle succession d'évènements naturels physiques, chimiques et biologiques, puis beaucoup plus récemment à l'échelle évolutive, des interventions de l'homme sur les milieux comme sur les êtres vivants. Le concept même de biodiversité a évolué : la science a permis de compléter l'étude de la

diversité des espèces (l'unité traditionnelle de l'étude de la biodiversité) par celle des gènes, puis dans le souci d'intégrer les relations entre les êtres vivants, par la connaissance des écosystèmes. Il en suit trois niveaux d'appréciation de la biodiversité : La diversité spécifique, la diversité génétique et la diversité écosystémique. La **diversité spécifique** désigne la variété en espèces d'une région. Cette diversité peut être mesurée de diverses manières. Le nombre d'espèces d'un milieu – sa « richesse » spécifique – est un critère souvent utilisé, de même que la diversité « taxinomique » ou la différence spécifique, qui tient compte des ressemblances taxinomiques et enfin l'«evenness» **spécifique** (en franc. : l'équitabilité) qui tient compte de l'importance relative d'espèce. Ces manières de mesurer la diversité spécifique peuvent être combinées afin de calculer des indices de diversité (*ex.* : Shannon Weaver) et d'obtenir une seule valeur pour un écosystème à un moment donné. Il convient de rappeler ici que le concept d'espèce pour tout organisme procaryotique ou pour tout virus, est plus abstrait. Nous parlerons plutôt d'OTU (Unité Taxonomique Opérationnel), qui est défini par les analyses phylogénétiques.

La **diversité génétique** est l'ensemble de l'information génétique contenue dans les êtres vivants ; elle rend compte de la variabilité génétique entre espèces et au sein d'une même espèce. Enfin, la **diversité écosystémique** décrit la variabilité des milieux (lacs, prairies, forêts, etc.) ; son étude inclut les relations entre les facteurs biotiques et abiotiques ainsi que les relations entre les êtres vivants.

Une autre façon de définir la diversité est la suivante. On peut parler de **diversité taxonomique** quand on prend en compte la proximité phylogénétique des différents organismes, et de **diversité fonctionnelle** quand on prend en compte la nature et le niveau de réalisation des fonctions accomplies par les organismes. Ce concept de diversité fonctionnelle est relativement récent (Martinez, 1996). La diversité fonctionnelle peut être estimée en mesurant des caractères métaboliques ou cataboliques (Weinbauer et Höfle, 1998 ; Wenderoth et Reber, 1999). Elle est mesurée de préférence en comptant le nombre de groupes fonctionnels d'un assemblage (Hooper et Vitousek, 1997 ; Tilman et al., 1997 ; Naeem, 2002; Petchey et al., 2004).

La reconnaissance, la définition et la classification des espèces en fonction de leurs liens de parenté sont nécessaires à l'étude de la biodiversité ; cela est l'objet d'une science appelée **systématique** qui constitue le fondement de toutes les recherches sur le monde vivant. On parle de systématique parce que les organismes sont rangés dans des systèmes dont on a préalablement défini des critères. **Aujourd'hui un des défis les plus passionnants est**

**de décrire et comprendre le couplage entre diversité fonctionnelle et diversité structurelle/taxinomique. Il faut noter que cet objectif ne vient pas en remplacement mais en supplément de l'étude de la classification simple. Celle-ci demeure la base essentielle de nombreux travaux de recherche et l'état des connaissances dans ce domaine reste à approfondir car de nombreux organismes sont encore à découvrir.** L'étude de la relation entre diversité fonctionnelle et structure des communautés ou populations doit nécessairement se faire en interaction avec l'approche systématique qui en quelque sorte, représente « l'alphabet » du langage écologique.

## **2. Bactéries et bactériophages, deux modèles d'étude pour appréhender l'origine de la biodiversité et son rôle dans le fonctionnement des écosystèmes**

La majorité des travaux se rapportant à l'étude de la biodiversité a été réalisée sur les macroorganismes, plantes et animaux (Hooper et Vitousek, 1997; Wardle et al., 2000). En revanche peu de travaux concernent les microorganismes, et en particuliers les bactéries et les virus (Degens, 1998; Griffiths et al., 2003) alors que ceux-ci constituent d'excellents modèles biologiques. En effet, les bactéries et les virus sont non seulement les composants biologiques les plus abondants sur Terre, mais ils sont également les plus divers comme le suggèrent des estimations récentes (Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). Ces microorganismes sont probablement ubiquistes, et leur manipulation est relativement facile. Enfin, les bactéries et les virus jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques et biologiques, et contribuent ainsi de façon significative à la stabilité et au fonctionnement des écosystèmes. Dans ce sous-chapitre n°2 nous essayerons de résumer les connaissances actuelles portant sur ces deux groupes biologiques.

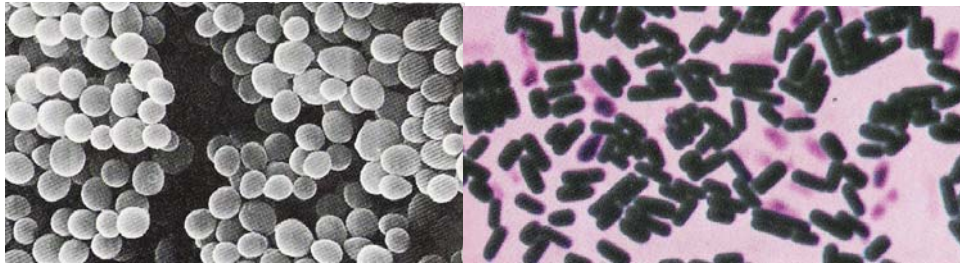
### **2.1. Les bactéries et plus particulièrement les eubactéries**

La découverte des bactéries revient à Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). Ce sont des organismes de petite taille et unicellulaires. Leurs ancêtres sont apparus sur Terre il y a environ quatre milliards d'années, soit deux fois plus tôt que les eucaryotes. Ces ancêtres ont

pu développer des voies métaboliques basiques et créer ainsi la biosphère. Ces organismes sont répartis en deux groupes principaux ; les **Archées** et les **eubactéries**.

### 2.1.1. Taille, forme, organisation cellulaire

La **taille** des bactéries est comprise en général entre 0,2  $\mu\text{m}$  et 2  $\mu\text{m}$ . Cependant, des bactéries d'une taille inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$  existent; elles sont appelées "ultramicrobactéries" et certaines d'entre elles ont été récemment découvertes en eau douce (Hahn, 2003; Hahn et al., 2003)). Inversement, d'autres bactéries sont plus grandes que 2  $\mu\text{m}$  et peuvent donc dépasser la taille d'une cellule eucaryote (*ex.* : certaines espèces de cyanobactéries). Les bactéries les plus communes ont deux formes, **la forme à coque ou à bâtonnet (bacille)** (Fig.1.). Un grand nombre d'autres formes existent (vibrions, pléomorphe,..) mais ces dernières représentent des formes mineures (Prescott et al., 1996).



**Fig. 1.** A gauche une bactérie en forme de coque (*Staphylococcus aureus*, X 32.000), à droite une à bâtonnet (*Clostridium perfringens*, X 800). D'après Prescott et al. (1996).

L'**organisation cellulaire** des bactéries est plus simple que celle observée chez les eucaryotes. Elles sont caractérisées surtout par l'absence d'un véritable noyau mais aussi l'absence d'organelles internes. Le matériel génétique est localisé dans le nucléoïde et n'est donc pas séparé du reste du cytoplasme par une membrane. De nombreuses bactéries présentent des plasmides qui sont des petites molécules d'ADN double brins, circulaires et qui peuvent exister indépendamment des chromosomes. Le transfert d'ADN entre bactéries (conjugaison) implique un contact direct et dépend de la présence de ces plasmides. Ces derniers contiennent souvent des gènes qui confèrent une résistance aux antibiotiques ou qui donnent un avantage sélectif aux bactéries qui les portent (Prescott et al., 1996). A part les mycoplasmes et quelques archéobactéries, la plupart des bactéries ont une paroi cellulaire en peptidoglycane qui les protège de la lyse osmotique et leur donne une forme. Sur la base du type de paroi, deux groupes majeurs de bactéries peuvent être distingués par la coloration de Gram : les Gram-positives (parois plus épaisses, donc plus solides) et les Gram-négatives

(plus complexe) (Prescott et al., 1996).

### **2.1.2. Reproduction et échanges de matériel génétique**

La **reproduction** chez les Procaryotes est végétative et asexuée ; la division se fait par scissiparité (bipartition d'un individu engendrant 2 nouveaux individus). Ce phénomène est connu aussi sous le terme de « transfert vertical de gènes ». Le temps de génération est court, en général entre quelques minutes et une semaine au maximum. Parallèlement à la reproduction végétative, des phénomènes de **parasexualité** existent, où l'on assiste à des échanges d'acides nucléiques entre bactéries et environnement. Ces échanges sont fréquents et sont connus aussi sous le terme de « transfert latéral de gènes » ou « transfert horizontal de gènes ». Les transferts horizontaux d'acides nucléiques entre deux bactéries se font par conjugaison (échange d'un fragment ADN ou plasmide), par transduction (échange par l'intermédiaire d'un virus ou phage) ou par transformation (absorption d'ADN externe). Ces trois types de phénomènes de parasexualités, revus par Taddei et al. (1996) et Davison (Davison, 1999), sont des mécanismes qui permettent aux bactéries d'évoluer, de s'adapter à un environnement qui change et de contribuer à la diversité intra- et inter-spécifique.

### **2.1.3. Ubiquité et nombre total de bactéries sur Terre**

La capacité à coloniser tous les types de milieux contribue aujourd'hui au caractère ubiquiste de la distribution des bactéries sur Terre. C'est ainsi qu'on les trouve tout d'abord dans des milieux offrant des conditions de vie optimale, des milieux riches en nutriments, tels que les sols, les sédiments, les lacs et les océans, ainsi que d'autres organismes, mais aussi dans des milieux extrêmes, considérés comme hostiles à la plupart des êtres vivants, tels que les milieux caractérisés par des températures très élevées (Brock, 1997; Ward et al., 1998), ou très froides (Price, 2000), les milieux à forte salinité (Anton et al., 2000), les milieux acides et toxiques (Baker et Banfield, 2003), les milieux à forte pression atmosphérique (Vezi et al., 2005), etc...

Le **nombre total de bactéries** sur Terre est estimé à  $4-6 \times 10^{30}$ . La plupart des bactéries se trouvent dans les subsurfaces océaniques et terrestres, dans le sol et les eaux océaniques (Whitman et al., 1998).

**Tab. 1.** Nombre total de cellules procaryotiques dans divers habitats. D'après Whitman et al. (1998).

| Habitat                           | Nombre total de cellules procaryotiques |
|-----------------------------------|---|
| Subsurface océanique <sup>1</sup> | $3,5 \times 10^{30}$                    |
| Subsurface terrestre <sup>2</sup> | $0,25 - 2,5 \times 10^{30}$             |
| Sol                               | $2,6 \times 10^{29}$                    |
| Océan ouvert                      | $1,2 \times 10^{29}$                    |
| Lacs                              | $1,3 \times 10^{26}$                    |
| Rivières                          | $1,2 \times 10^{24}$                    |

<sup>1</sup> : < 10 cm ; <sup>2</sup> : < 8m

#### **2.1.4. Abondance bactérienne en milieu aquatique et facteurs de régulation de celle-ci**

L'abondance des cellules bactériennes dans les milieux aquatiques varie en général entre  $10^5$  et  $10^7$  cell.mL<sup>-1</sup> (Hobbie et al., 1977; Bettarel et al., 2003a). Il convient cependant de rappeler que seule une fraction de la communautés bactérienne est réellement active. Parmi la fraction non active, on distingue les cellules qui se trouvent dans un état physiologique de dormance et les cellules déjà mortes (Zweifel et Hagström, 1995 ; Bernard et al., 2000; Lebaron et al., 2001 ; Luna et al., 2002 ; Smith et Del Giorgio, 2003 ). A titre d'exemple, les travaux de Dufour et Colon (1992) ont montré que la proportion de cellules respirant activement dans le lac Léman variait de 9% au sein de l'hypolimnion en fin d'hiver à 65% dans l'épilimnion en été.

Divers **facteurs de régulation** contrôlent le nombre total de cellules bactériennes dans les écosystèmes. Nous distinguons les facteurs ascendants ou "bottom-up" des facteurs descendants ou "top-down" (Borics, 2000; Muylaert et al., 2002; Jardillier et al., 2004). Les facteurs ascendants sont les ressources organiques (notamment les ressources organiques carbonés) et minérales qui peuvent provenir d'apports allochtones ou autochtones (*ex.* : exudats synthétisés par le phytoplancton ou issus de l'excrétion des prédateurs, etc. ; (Cole et al., 1982; Pace et Cole, 1994; Crump et al., 2003)). C'est l'action conjointe des nutriments inorganique et organiques qui semble le plus important pour la croissance bactérienne (Smith et Prairie, 2004). Les facteurs descendants concernent essentiellement la prédation. Les organismes prédateurs de bactéries, tels que les nanoflagellés hétérotrophes et les ciliés, sont généralement considérés comme les bactérivores majeurs ; certains métazoaires, tels que les daphnies, sont également considérés comme étant des prédateurs importants des bactéries à

certaines périodes de l'année (Simek et al., 1990; Berninger, 1991; Thouvenot et al., 1999; Kisand et Zingel, 2000; Vaqué et al., 2002). Un troisième type de contrôle des populations bactériennes est le parasitisme viral. Différents auteurs ont pu mettre en évidence que la lyse virale pouvait jouer en effet un rôle non négligeable dans le contrôle de la dynamique des communautés bactériennes (Fischer et Velimirov, 2002; Bettarel et al., 2003b; Weinbauer, 2004; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004) : cet effet pouvant même être supérieur à l'effet du broutage dans certaines conditions environnementales (Guixa-Boixereu et al., 1999; Jacquet et al., 2005b).

### **2.1.5. Les bactéries aquatiques fixées et libres : deux communautés différentes ?**

En milieu aquatique pélagique, les bactéries peuvent se trouver à l'état "libre" ("free living") ou fixées aux particules, à des agrégats de plus grande taille ou à d'autres organismes ("particle-attached") (revue par Nold et Zwart (1998)). En milieu aquatique, deux types d'agrégats existent, les microagrégats (< 500 µm) et les macroagrégats (> 500 µm, "lake snow" ou "marine snow"). L'étude des deux communautés de bactéries, libre et fixée, nécessite une étape de filtration qui sépare les cellules fixées des cellules libres. Différents auteurs séparent les deux types de cellules en filtrant les échantillons d'eau à travers des filtres de porosités égales à 1, 3, 5 ou 10 µm, selon la charge en particule des eaux (Wright et Coffin, 1983 ; Palumbo et al., 1984; Worm et al., 2001; Selje et Simon, 2003). La dégradation de la matière organique en milieu aquatique est pour une grande partie due aux bactéries fixées (Smith et al., 1992). Le fait de se fixer sur une particule permet aux cellules bactériennes de trouver de plus fortes concentrations en substrat (Alldredge et al., 1993; Long et Azam, 1996) et d'être moins vulnérables à la prédation (Jürgens et Güde, 1994). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont mis en évidence que la fraction de bactéries fixées serait plus active (*ex.* : activités ectoenzymatiques,...), de plus grande taille et se caractériserait par un taux de croissance supérieur, comparé à la fraction de bactéries libres (Caron et al., 1982; Pedros-Alio et Brock, 1983; Simon, 1985; Iriberry et al., 1987; Smith et al., 1992; Unanue et al., 1992; Hoppe et al., 1993). D'autres auteurs ont pu mettre en évidence que les deux fractions se distinguent d'un point de vue taxinomique (DeLong et al., 1993; Bidle et Fletcher, 1995; Acinas et al., 1997; Acinas et al., 1999; Crump et al., 1999; Knoll et al., 2001; Schweitzer et al., 2001). Cependant, quelques travaux ne sont pas en accord avec les résultats précédents et concluent au contraire, que les deux fractions se ressemblent d'un point de vue fonctionnelle (Worm et al., 2001) ou taxinomique (Selje et Simon, 2003). Enfin, la proportion de cellules fixées et de



cellules libres varie d'un écosystème à l'autre; à titre d'exemple, cette proportion a été estimée à quelques pour cents dans le Léman par exemple (Stroffek, 1990) et à 73%, dans le lac Tanning au Danemark (Riemann, 1978). Pour conclure sur ce sujet, Riemann et Winding (2001) suggèrent que les deux communautés interagissent de façon dynamique et que le degré de similarité taxonomique dépend de la nature du substrat (*ex.* : âge, origine, structure, composition, etc..). L'influence du type de substrat avait été suggérée auparavant par Hollibaugh et al. (2000). La composition du substrat et notamment le rapport entre C et N du substrat même est connu comme un des facteurs pouvant influencer la capacité de minéralisation des bactéries (Billen, 1984; Caron et al., 1988; Bérard et al., 1995).

#### **2.1.6. Diversité métabolique des bactéries**

La **diversité métabolique** des bactéries est remarquable et explique en partie leur capacité à peupler des milieux si différents et si extrêmes. Les mesures et analyses des voies métaboliques peuvent se faire seulement après mise en culture des bactéries. La différence entre le faible nombre de bactéries cultivable (< 1 % ; (Aman et al., 1995)) et le nombre important de bactéries comptées par microscopie pour un même échantillon a été appelée "the Great Plate Count Anomalie" (Staley et Konopka, 1985; Connon et Giovannoni, 2002). Les techniques de mise en culture, avérées inaptes à l'étude de la diversité taxonomique, ont néanmoins permis d'étudier en partie leur diversité métabolique. Des modes de conversion d'énergie, des voies métaboliques uniques de même que la variété des substrats utilisables comme source d'énergie ont pu ainsi être mis en évidence (Brock, 1987). Sur la base de leur source d'énergie, on distingue les bactéries autotrophes lithotrophes (elles utilisent du carbone inorganique), les bactéries photoautotrophes (elles utilisent l'énergie solaire) oxygénique comme les cyanobactéries ou anoxygénique comme les bactéries vertes et les bactéries hétérotrophes (elles utilisent des substrats organiques).

#### **2.1.7. Rôle fonctionnel des bactéries**

Les bactéries sont une composante essentielle de la zone pélagique du fait de leur biomasse (Cho et Azam, 1988 ; Simon et al., 1992) d'une part, et de leur rôle dans le recyclage des nutriments et de décomposition de la matière organique d'autre part (Fisher et al., 2000). Dans certains cas, la biomasse des bactéries peut être supérieure à celle du phytoplancton (Fuhrman et al., 1989). On peut considérer les bactéries comme une source

potentielle de carbone, d'azote et de phosphore car elles stockent une grande partie de ces éléments. Whitman et al. (1998) estiment que le contenu cellulaire procaryotique en carbone sur Terre est de 350 à 550 Pg de C (1 Pg =  $10^{15}$  g), soit 60 à 100% du contenu en carbone dans les Plantes. Le carbone, l'azote et le phosphore sont nécessaires à la croissance des bactéries, et peuvent faire l'objet d'une compétition entre les algues et les bactéries lorsqu'ils sont sous une forme dissoute (Kirchman, 1994; Pakulski et al., 1996; Whitman et al., 1998). Ainsi, malgré leur faible taille, les bactéries contribuent de façon notable aux flux de matières. Leur importance dans les flux de carbone au sein des écosystèmes aquatiques est une découverte récente que l'on doit principalement aux travaux de Hobbie et al. (1977). Plus précisément, la respiration bactérienne au sein des océans a été identifiée comme une des composantes majeures du flux de carbone dans la biosphère (Del Giorgio et Duarte, 2002). Dans la boucle microbienne les bactéries ont principalement deux fonctions : 1) elles dégradent la matière organique qui devient ainsi plus facilement assimilable par d'autres organismes (Marvalin, 1987), typiquement le phytoplancton autotrophe, qui représente à son tour une source de nourriture pour le phytoplancton zooplancton de plus grande taille (Knoechel et Holtby, 1986) et 2) elles sont une source de nourriture directe pour les niveaux trophiques supérieurs, notamment les protistes flagellés et ciliés et le zooplancton de petite taille (Sanders et al., 1989).

### **2.1.8. Diversité taxonomique des bactéries**

Le **nombre total d'espèces bactériennes réellement présentes sur Terre** demeure énigmatique. En 2001, seulement 5.000 espèces bactériennes étaient cultivées, décrites et reconnues comme telles (Bull et al., 1992). Cependant, l'application de méthodes statistiques permet non seulement de comparer des communautés provenant de différents écosystèmes mais aussi d'estimer le nombre total d'espèces au sein d'un écosystème donné, comme sur la Terre entière (Colwell et Coddington, 1994; Hughes et al., 2001; Martin, 2002; Bohannan et Hughes, 2003; Colwell et al., 2004). Sur la base de ces estimations, Dykhuizen (1998) évalue à plus de 10 milliards le nombre d'espèces bactériennes sur Terre. Dykhuizen pense que ce nombre tend vers une augmentation continue du fait à la fois d'une spéciation facile et d'un taux d'extinction réduit.

#### **2.1.8.1. Les techniques basées sur la mise en culture**

La plupart de nos connaissances sur les micro-organismes proviennent d'études

réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement au moyen de **méthodes traditionnelles de mise en culture**. L'isolement est précédé par une phase d'enrichissement qui favorise la croissance d'un type donné de microorganisme, sélectionné en fonction des conditions physiques et chimiques du milieu. On distingue deux types de milieux, les milieux électifs (les souches les plus adaptées vont se développer) et les milieux sélectifs (on intervient physiquement ou chimiquement pour favoriser la croissance d'un type donné d'organisme). Afin de disposer d'un milieu sélectif, on ajoute alors soit un élément nutritif nécessaire, soit au contraire on supprime un composé utilisé pratiquement par tous les organismes que l'on ne souhaite pas isoler. A partir de l'enrichissement il est alors possible d'isoler des souches pures, soit par étalement sur boîte, soit avec une dilution successive en milieu liquide ou dans l'agar (Corre, 2000). Une fois la souche isolée, il convient de la caractériser d'un point de vue phénotypique et génotypique.

Cependant, compte tenu des limitations techniques associées aux méthodes traditionnelles seulement moins d'1% de toutes les espèces bactériennes ont pu être décrites (Ward et al., 1990; Amann et al., 1995; Dykhuizen, 1998). Jones estime que moins de 0,25% des bactéries d'eau douce ont la capacité de pousser en culture (Jones, 1977). Ce décalage est à attribuer à différentes causes (Amann et al., 1995; Joux et Lebaron, 1995; Ward et al., 1999). Ainsi, le milieu de culture choisi ne peut être universel et l'ensemble des conditions de l'environnement ne peuvent être reproduites sur un seul et même milieu de culture; certaines cellules hors de leur environnement peuvent entrer dans un état viable mais non-cultivable; des populations numériquement inférieures peuvent supplanter des populations majoritaires mais moins adaptées au milieu de culture; certaines cellules sont impossibles à obtenir pures en culture comme c'est le cas de microorganismes symbiotes et syntrophes, etc. Concernant ce dernier point, des molécules "signal", secrètes par d'autres organismes sont parfois essentielles à la croissance de certaines bactéries (*cf.* (Bruns et al., 2003)).

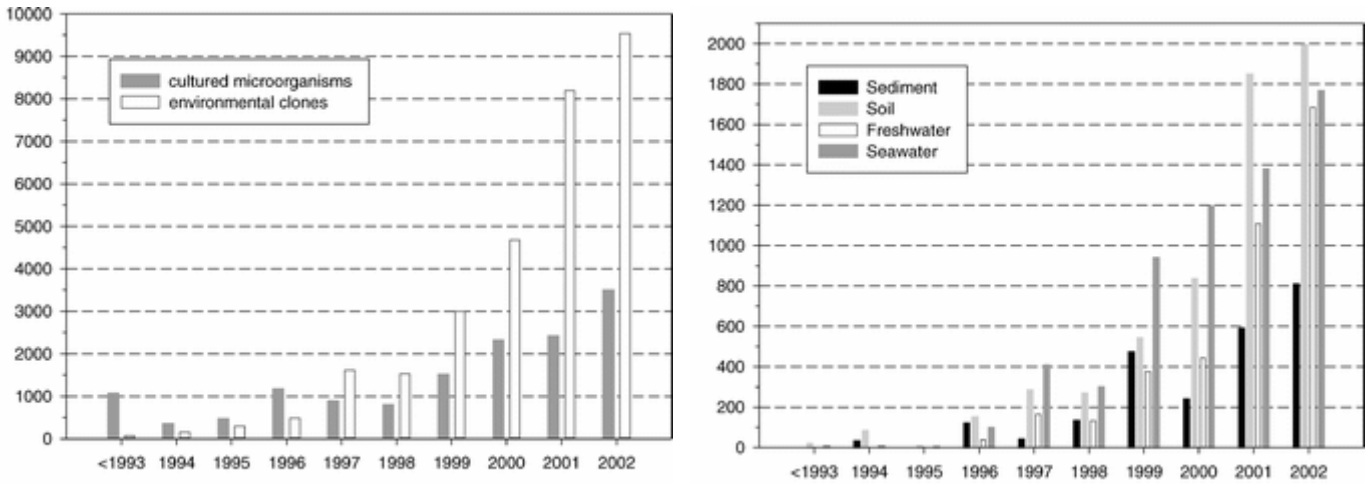
Le développement de **nouvelles techniques de mise en culture** (*ex.* : utilisation d'un milieu appauvri en nutriments, utilisation de molécules "signal", etc.) a permis de cultiver une plus grande variété d'espèces bactériennes (Connon et Giovannoni, 2002; Kaeberlein et al., 2002; Zengler et al., 2002; Bruns et al., 2003; Stevenson et al., 2004), et le développement de techniques d'analyse moléculaire a permis de détecter des bactéries jusqu'ici inconnues (Woese, 1987; Amann et al., 1995; Vandamme et al., 1996; Pace, 1997; Head et al., 1998; Hugenholtz et al., 1998).

### 2.1.8.2. Les techniques biomoléculaires

L'émergence des **technologies moléculaires** en écologie microbienne est liée d'une part au développement de la phylogénie moléculaire à la fin des années soixante par Zuckerkandl et Pauling (1965) qui considérèrent les molécules comme des marqueurs de l'histoire évolutive et développèrent le concept d'horloge moléculaire (les mutations s'accumulent au cours du temps et le taux d'accumulation est fonction de l'intensité de la pression de sélection), et d'autre part au choix de l'ARN ribosomique comme marqueur évolutif à la fin des années soixante dix (Woese et Fox, 1977). Woese et ses collaborateurs se sont intéressés à la petite sous-unité de l'ARNr (le **16S chez les Procaryotes** et le 18S chez les Eucaryotes) pour plusieurs raisons (Pace et al., 1985; Ludwig et Schleifer, 1994; Ludwig et al., 1998) :

- sa présence est universelle et il accomplit le même rôle chez tous les organismes ;
- sa séquence contient des domaines dont les vitesses d'évolution varient ;
- la séquence a évolué lentement et n'est pas le résultat de transferts latéraux ;
- elle est facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules ;
- sa séquence est préférable au 5S ou au 23S (pour les Procaryotes) en raison de sa taille permettant de réaliser des inférences phylogénétiques suffisamment cohérentes ; etc.

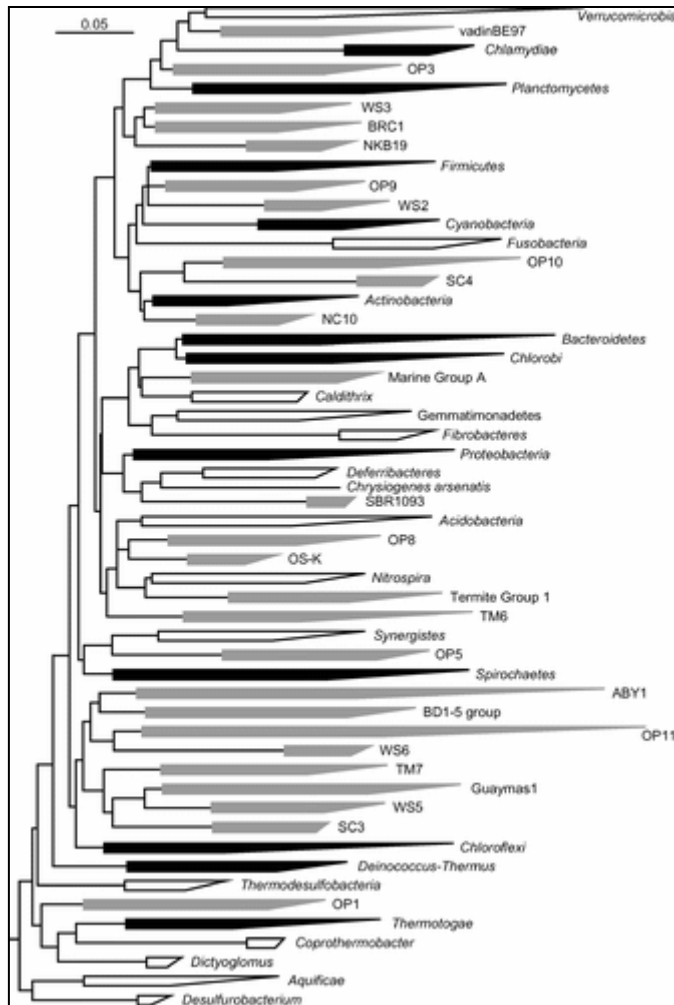
Les premiers travaux d'écologie microbienne moléculaire provinrent de l'équipe de Pace qui utilisa les travaux de Woese pour accéder à la diversité d'échantillons environnementaux (Olsen et al., 1986; Pace et al., 1986a; Pace et al., 1986b). De nombreuses publications se sont proposées de décrire sous forme de revue les techniques moléculaires employées en écologie microbienne (Turner et al., 1989; Olson, 1991; Pickup, 1991; Atlas et al., 1992; Olson et Tsai, 1992; Ward et al., 1992). Depuis l'étude pionnière de Giovannoni et al. (Giovannoni et al., 1990) concernant l'analyse de la diversité d'assemblages naturels de microorganismes marins par l'utilisation de techniques de clonage-séquençage basées sur l'amplification de séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomal, le nombre de séquences d'ADN dans les bases de données mondiales continue sans cesse d'augmenter. En observant la Fig 2. on remarque surtout que le nombre de séquences en provenance de méthodes biomoléculaires augmente à partir de 1996, date à partir de laquelle, l'utilisation de ces analyses est devenue routinière.



**Fig.2.** Nombre de séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S publiées dans la banque mondiale GenBank (ordonnée) en fonction de l'année (abscisse). Toutes les séquences publiées avant 1993 sont regroupées dans la première colonne (< 1993). A gauche : le nombre de séquences relatives à des bactéries cultivées (*Archaea* et *Eubacteria*) contre le nombre de séquences en provenance d'études non basées sur des méthodes de mise en culture (clones environnementaux), en fonction de l'année. A droite : nombre total de séquences de clones environnementaux en provenance d'échantillons du sédiment, du sol, des eaux douces et marines. D'après Rappé et Giovannoni (2003).

En 1987, Woese (1987) a montré, sur la base de séquences d'ADN codant pour l'ARN 16S, que **les êtres vivants étaient divisés en trois grands domaines (Eubacteria, Archaea, Eukarya)** en abandonnant ainsi la dichotomie classique du monde vivant des Procaryotes et des Eucaryotes (Fig.3.) Dans ces travaux il décrit les Archaea et 12 phyla eubactériens (Woese, 1987; Woese et al., 1990). Par la suite, Hugenholtz décrit 36 phyla bactériens (Hugenholtz et al., 1998; Hugenholtz, 2002), un tiers étant des "phyla candidates", c'est à dire des phyla pour lesquels il n'existe pas de représentants cultivés proches (les espèces appartenant aux candidate phyla sont connues seulement par leurs gènes. Enfin, Rappé et Giovannoni (2003) ont récemment reporté la présence de **52 phyla bactériens**, dont 26 ont été classés comme étant des divisions candidates (Fig. 4).

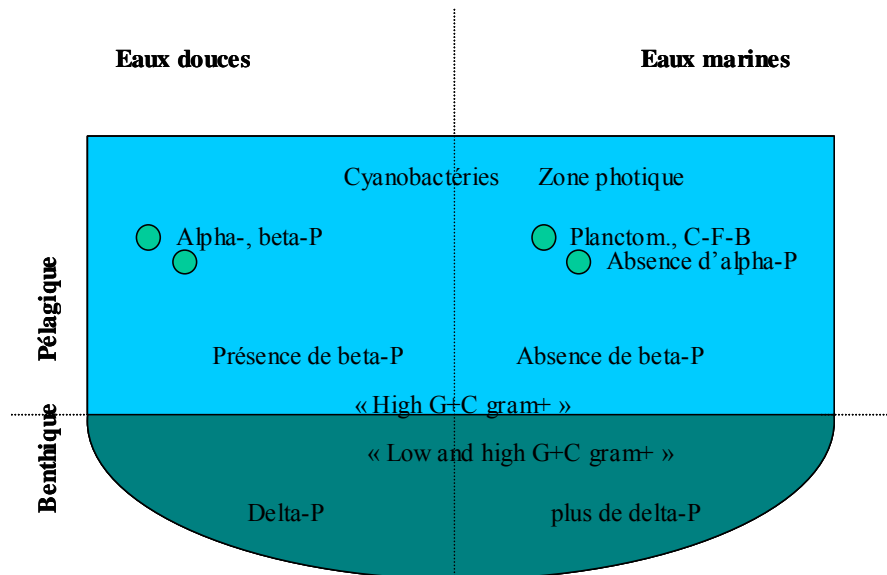




**Fig.4.** Arbre phylogénétique d'après Rappé et Giovannoni (2003). En noir les phyla décrit par Woese (1987), en blanc les phyla pour lesquelles des représentants cultivés existent et en gris les candidates.

Certains de ces phyla apparaissent majoritairement dans certains types d'écosystèmes (eau marine, eau douce, sol,..) et pas dans d'autres. Il apparaît que les environnements pélagiques marins hébergent des communautés bactériennes différentes par rapport à celles des environnements pélagiques d'eau douce (Méthé et al., 1998; Glöckner et al., 1999; Zwart et al., 2002). L'étude bibliographique de Nold et Zwart (1998) met clairement en évidence

quels sont les **phyla bactériens majeurs dans les écosystèmes aquatiques**, plus particulièrement quels sont les phyla de bactéries fixées aux particules et libres, caractérisant les zones pélagiques et benthiques des milieux marins et d'eau douce (Fig.5.). Brièvement, les *Actinobactéries* traditionnellement associées aux écosystèmes terrestres (Goodfellow et Williams, 1983; Rheims et al., 1999) sont probablement un des groupes les plus abondants du bactérioplancton d'eau douce (Glöckner et al., 2000; Sekar et al., 2003) ; les *Verrucomicrobiales*, les  $\alpha$ -*Protéobactéries* et  $\gamma$ -*Protéobactéries* (les  $\gamma$ -*Protéobactéries* sont dominantes en eau marine) et les cyanobactéries sont présentes dans la plupart des systèmes aquatiques; les  $\delta$ -*Protéobactéries* sont caractéristiques des eaux anoxiques et des sédiments, alors que les bactéries appartenant au phylum des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* se trouvent majoritairement sur des agrégats flottants marins et d'eau douce (Brachvogel et al., 2001). Les  $\beta$ -*Protéobactéries* sont quasiment absentes des milieux marins, alors qu'elles peuvent dominer dans certains écosystèmes d'eau douce (Glöckner et al., 1999) et constituer ici une partie substantielle de la communauté fixée (Weiss et al., 1996; Brachvogel et al., 2001; Knoll et al., 2001; Schweitzer et al., 2001). Contrairement à ce que l'on pensait, la présence parfois importante d'*Archaeobactéries* a été observée dans les milieux aquatiques non extrêmes (DeLong, 1992; Massana et al., 1997; Ochsenreiter et al., 2003; Etien, 2005). D'autres phyla sont, en général, peu nombreux mais néanmoins importants dans les écosystème aquatiques : il s'agit des *bactéries vertes*, des *Fibrobacter* et des *Acidobacterium*.



**Fig.5.** Distribution des groupes taxonomiques microbiens en eau douce ou salée, en milieu pélagique ou benthique. Les cercles représentent des agrégats/particules/d'autres organismes sur lesquels se trouvent les bactéries fixées. D'après Nold et Zwart (1998).



### **2.1.8.3. Espèce égale à OTU ?**

Selon la définition classique proposée par Ernst Mayr (Mayr, 1982), une espèce est un ensemble d'individus féconds entre eux et seulement entre eux, donc isolés des autres groupes d'être vivants. Ce concept est encore communément utilisé pour définir une espèce chez les organismes supérieurs mais il est de façon évidente inapplicable aux bactéries, notamment en raison de l'absence de vraie sexualité. De plus, à la différence des Eucaryotes, les caractères morphologiques des Procaryotes considérés seuls, n'ont qu'une faible signification dans la classification des bactéries, car la grande majorité des microorganismes ont des formes trop simples pour qu'on puisse les utiliser pour la taxinomie. Le développement d'outils de biologie moléculaire a permis de contourner ces problèmes. La définition d'espèce bactérienne est fondée sur les propriétés de dénaturation et de renaturation du double brin d'ADN génomique bactérien en fonction de la température (analyses de réassociation d'ADN). Une espèce procaryotique est constituée de souches qui présentent des valeurs d'hybridation ADN-ADN supérieure ou égales à 70% et une valeur  $\Delta T_m$  inférieure ou égale à 5% (Wayne et al., 1987). La généralisation de l'analyse de l'ADNr a incité de nombreux scientifiques à se questionner sur la correspondance entre une séquence d'ADN codant pour la petite sous unité ribosomale et une espèce bactérienne (Fox et al., 1992; Stackebrandt et Goebel, 1994; Palys et al., 1997; Rosello-Mora et Amann, 2001). C'est ainsi qu'une corrélation entre les pourcentages d'identités entre ARNr 16S et les pourcentages de réassociation ADN/ADN a été recherchée. En général, les séquences d'ADNr ayant des identités inférieures à 97% correspondent à des espèces différentes. Amann et al. (1995) abaissent par précaution cette limite à 95%.

Pour s'affranchir des difficultés de définition d'une espèce, nombreux sont les auteurs qui utilisent le concept d'Unité Taxonomique Opérationnelle (**OTU**). Kroes et al. (1999) définissent un OTU comme un groupe de séquences d'ADN ribosomal 16S dans lequel les séquences se ressemblent à hauteur de 99% alors que McCaig et al. (1999) fixent cette limite à 97%.

### **2.1.9. L'origine de la diversité bactérienne**

Des contraintes d'ordre pratique et théorique ont fortement limité (et certaines limitent encore) l'évaluation de la biodiversité bactérienne et l'identification des facteurs et des processus expliquant cette diversité. Ces contraintes concernent à la fois la faible proportion de bactéries cultivables (Dykhuisen, 1998), leur abondance considérable au sein d'un échantillon, leur grande diversité (Torsvik et al., 1990) et enfin la difficulté à définir une

espèce bactérienne, et ont contribué ensemble au fait que nos connaissances concernant la biodiversité des bactéries sont encore relativement limitées.

Certaines des contraintes décrites ci-dessus, ont pu être contournées par le développement d'outils biomoléculaires qui permettent l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Ainsi, des réponses ont pu être données aux questions suivantes : Est-ce que les communautés bactériennes sont différentes d'un écosystème à l'autre ? Quelle est la variabilité de la diversité au sein d'un même écosystème ? Quels facteurs influencent la diversité bactérienne ?

### **2.1.9.1. Influence relative des facteurs biotiques et abiotiques sur la diversité bactérienne**

Un certain nombre d'études conduites en milieu aquatique montre que divers **facteurs environnementaux abiotiques et/ou biotiques** peuvent avoir une influence sur la composition des communautés bactériennes (Nold et Zwart, 1998).

#### 2.1.9.1.1. L'influence des facteurs physico-chimiques

La diversité bactérienne en milieu aquatique peut être influencée par la température (Ferris et al., 1996; Ferris et Ward, 1997; Ward et al., 1998; Simon et al., 1999; Yannarell et Triplett, 2004), la concentration en oxygène (Bosshard et al., 2000; Humayoun et al., 2003; Vetriani et al., 2003) les conditions osmotiques, telles que la salinité (Murray et al., 1996; Nübel et al., 2000; Casamayor et al., 2002) (un exemple de cela est la quasi absence de  *$\beta$ -Protéobactéries* des milieux marins), le pH (Hiorns et al., 1997; Lindström et Leskinen, 2002) et les nutriments (notamment la qualité et la quantité de la MOD ; (Pinhassi et al., 1999; Eilers et al., 2000a; Covert et Moran, 2001; Pinhassi et Berman, 2003)). Les nutriments organiques et minéraux proviennent de la dégradation des organismes morts, de la lyse des cellules, de la production primaire libérant du COD, de l'excrétion du zooplancton, des apports liés aux activités humaines, etc. Les nutriments peuvent être d'origine allochtones ou autochtones (Crump et al., 2003). Un écosystème oligotrophe peut être particulièrement réceptif aux apports allochtones apportés par le milieu environnant, alors que les systèmes eutrophes fonctionnent beaucoup plus sur le recyclage interne de la matière organique. Différentes études ont montré l'influence des nutriments organiques sur la composition de la diversité bactérienne (Méthé et Zehr, 1999; van Hannen et al., 1999, Yannarell et Triplett, 2004; Lindström et Leskinen, 2002; Eiler et al., 2003). D'autres études ont montré l'influence des nutriments minéraux, tels que l'azote, le phosphore, l'ammonium, le fer etc. (Pakulski et al.,

1996; Lebaron et al., 1999; Fisher et al., 2000; Schäfer et al., 2001). Certains groupes taxonomiques de bactéries semblent être favorisés en présence de certains types de nutriments. Ainsi, les bactéries appartenant aux *C-F-B* sont connues pour leur capacité à dégrader des biopolymères et des macromolécules organiques dissoutes (Cottrell et Kirchman, 2000; Kirchman, 2002a; Zwisler et al., 2003), et de supplanter, ensemble avec les  $\beta$ -*Protéobactéries*, les autres phyla sur les microagrégats en système lacustre (Brachvogel et al., 2001). Les  $\gamma$ -*Protéobactéries* deviennent dominantes dans les milieux enrichis en nutriments, tels que les milieux de culture, et cela grâce à leur développement rapide et leur comportement opportuniste qui leur permettent d'être plus compétitives par rapport à d'autres groupes bactériens (Pinhassi et Berman, 2003), même si certaines d'entre elles croissent seulement en milieux très appauvris (Cho et Giovannoni, 2004). Les  $\beta$ -*Protéobactéries* sont également capables de proliférer dans des milieux à fortes concentrations en carbone organique dissous (Burkert et al., 2003) ; elle constituent généralement le groupe dominant au sein des communautés lacustres (Zwisler et al., 2003), notamment sur les agrégats macroscopiques organiques en système lacustre ("lake snow") (Weiss et al., 1996) et sur les microagrégats en système lacustre également (Brachvogel et al., 2001). Les  $\alpha$ -*Protéobactéries* constituent très souvent le deuxième groupe le plus abondant se développant sur ces agrégats (Weiss et al., 1996; Schweitzer et al., 2001). Les *Actinobactéries* au contraire, se développent plutôt dans des milieux présentant des concentrations faibles en nutriments (Burkert et al., 2003) et sont capables de dégrader des molécules complexes, telles que la lignine, la chitine et les protéines (Ramachandra et al., 1988; Jiang et Xu, 1996; Mercer et al., 1996).

Les radiations ultra-violettes sont suspectées d'influencer la diversité des communautés bactériennes tout comme elles sont capables d'influencer la diversité d'autres communautés microbiennes, telles que le phytoplancton et les protistes (Davidson et Belbin, 2002). Cependant, Winter et al. (2001), ont montré que l'exposition à des radiations UV (280 et 400 nm) n'induisait que de faibles changements dans la composition de la communauté bactérienne étudiée. L'impact des radiations lumineuses sur la diversité bactérienne mériterait certainement d'être approfondi dans le cadre d'études complémentaires. Récemment, Schwalbach et al. (2005) ont révélé que la lumière n'avait pas d'impact sur la structuration de la communauté bactérienne hétérotrophe marine.

Une autre question qui mériterait également d'être plus amplement examinée est l'étude de la turbulence et de ses effets sur la diversité bactérienne. En effet, des études mettent en évidence les effets des turbulences sur les prédateurs (Peters et al., 2002) et, par ailleurs, les modifications de la composition bactérienne sous l'effet de la prédation est un fait

reconnu (Pernthaler et al., 2001; Corno, 2004).

#### 2.1.9.1.2. L'influence des facteurs de contrôle biotique

Une multitude de facteurs biotiques peut, tout comme les facteurs abiotiques, influencer la diversité bactérienne : la prédation ou le broutage (Simek et al., 1997; Jürgens et al., 1999; Simek et al., 1999; Suzuki, 1999; Hahn et Hofle, 2001; Langenheder et Jurgens, 2001) et l'infection virale (Jiang et Paul, 1998; Middelboe, 2000; Tarutani et al., 2000; Middelboe et al., 2001; Fuhrman et Schwalbach, 2003; Schwalbach et al., 2004). Les résultats d'une étude récente ont confirmé les effets directs (lyse de cellules) et indirects (accroissement de composants organiques suite à la lyse) de la lyse virale sur la composition des communautés procaryotiques d'eau douce (Jardillier et al., 2005a).

Certaines études suggèrent une co-évolution entre proie/cellule hôte et prédateurs/virus qui permettrait aux bactéries d'échapper aux prédateurs (Hahn et Hofle, 1999) et de résister aux attaques virales (Garvey et al., 1996; Bohannan et Lensky, 2000; Buckling et Rainey, 2002; Mendzhul et al., 2004). Il peut s'agir d'une évolution morphologique, parfois associée à des changements génétiques.

D'autres facteurs et processus biotiques sont la compétition ou les caractéristiques de la végétation environnante, des macrophytes, de la composition d'espèces phytoplanctoniques (Van der Gucht et al., 2001; Kuske et al., 2002; Pinhassi et al., 2004). Il est intéressant de souligner l'influence de molécules dites allélopathiques (ou « molécule signal ») biosynthétisées et libérées dans le milieu par des organismes tels que les bactéries, les microalgues et les prédateurs/brouteurs. Ce phénomène a été mis en évidence par plusieurs auteurs (Suikkanen et al., 2004, Corno, 2004). Des changements de la diversité bactérienne ont été caractérisés au cours de proliférations de microalgues, notamment en début et en fin de ces proliférations. Ces changements de diversité reflètent probablement le développement de phylotypes bactériens intervenant dans la colonisation et la dégradation de particules (van Hannen et al., 1999; Riemann et al., 2000; Fandino et al., 2001; Riemann et Winding, 2001). Ces résultats contrastent avec les résultats de Rieman et Middelboe (2002) qui ont trouvé peu de changements de diversité bactérienne (et virale) en relation avec un bloom de coccolithophorides dans une eau côtière danoise. Cela est probablement lié à une plasticité fonctionnelle de certains groupes fonctionnels à supporter des conditions de croissances différentes.

La production primaire (taux de capture d'énergie et de fixation de carbone par les producteurs primaires) est également connue comme un processus biotique capable

d'influencer la diversité bactérienne (Benlloch et al., 1995; Torsvik et al., 1998; Kassen et al., 2000; Yannarell et Triplett, 2004). Horner-Devine et al., (2003b) ont montré un effet stimulant et un effet inhibiteur de la production primaire sur la richesse de certains groupes de bactéries et un effet nul pour d'autres groupes.

L'introduction de bactéries allochtones peut modifier la diversité des communautés bactériennes autochtones (Schauer et al., 2000; Crump et al., 2003; Crump et al., 2004). Des travaux de recherche en milieux lacustres ont mis en évidence l'importance des affluents et des bassins versants quant à l'apport de bactéries allochtones (Lindström, 1998; Lindström et Bergström, 2004). Un inventaire des cellules bactériennes du Lac Ortrasket, en Suède, a montré que 29% des nouvelles cellules de certaines couches d'eau provenaient d'un affluent du lac (Bergström et Jansson, 2000).

Enfin, nous pouvons évoquer l'influence de l'homme et de ses activités, qu'elles soient d'origine agricole (McCaig et al., 1999; Tilman et al., 2001), industrielle ou urbaine (Mueller et al., 2001; Röling et al., 2001) sur la diversité bactérienne. L'introduction chronique ou accidentelle de xénobiotiques dans les milieux naturels aquatiques suite au déversement direct de polluants ou à l'arrivée des polluants à travers le bassin versant, peut engendrer des effets sur la structure d'une communauté bactérienne. On peut distinguer les effets directs de ces polluants, c'est-à-dire les effets ayant une influence sur les organismes, en favorisant le développement de certaines espèces au détriment d'autres espèces (et inversement), des effets indirects agissant sur les organismes par la modification des caractéristiques physico-chimiques et biologiques du milieu dans lequel les bactéries évoluent.

#### 2.1.9.1.3. L'influence de deux variables complexes : l'espace et le temps

Il est difficile d'évaluer l'influence propre sur la diversité bactérienne de la profondeur car plusieurs variables biologiques et facteurs physicochimiques évoqués précédemment (nutriments, O<sub>2</sub>, température, pression hydrostatique, prédation, etc.) sont aussi corrélées à cette variable. Parmi les variables physiques directement définies par la profondeur, la pression hydrostatique ; qui augmente de façon linéaire avec la profondeur, favorise le développement d'organismes barophiles ou piezophiles (Vezzi et al., 2005). Les colonnes d'eau sont souvent caractérisées par la présence de couches stratifiées de densités différentes ; ces différences sont dues à des variations de température et/ou de salinité. Ces couches se mélangent difficilement entre elles, ce qui a pour conséquence de favoriser la formation de gradients au sein de la colonne d'eau. On observe ainsi des gradients d'intensité lumineuse, de

composition spectrale de la lumière, de concentration en oxygène, de concentration en nutriments, etc. (Pourriot et Meybeck, 1995). Cette distribution hétérogène de ces diverses variables physicochimiques mais aussi biologiques est à l'origine d'une structuration de la diversité bactérienne le long de la colonne d'eau. Ainsi, plusieurs études mettent en évidence une relation entre les communautés bactériennes et l'hydrographie : les diverses couches d'eau hébergeant souvent des communautés distinctes (Øvreås et al., 1997; Murray et al., 1998; Dominik et Höfle, 2002). D'autres études ayant pris en compte des échelles spatiales horizontales et verticales, montrent que la variabilité spatiale horizontale est en général beaucoup moins importante que la variabilité verticale (Riemann et al., 1999; Schauer et al., 2000).

De la même manière que la profondeur, l'étude des variations saisonnières nécessite de prendre en compte plusieurs facteurs biologiques et physico-chimiques qui évoluent de façon hétérogène au cours du temps. Ainsi, dans le Lac Plußsee (réservoir eutrophe), Höfle et al. (1999) ont constaté une diminution drastique de la diversité bactérienne à deux occasions; au printemps durant la phase des eaux claires par l'effet du broutage des bactéries par le zooplancton, et en fin d'été par la dominance dans la communauté algale d'une espèce de dinoflagellés. Des résultats similaires ont été obtenus dans un autre lac eutrophe américain (Yannarell et al., 2003). Les études ayant pris en compte ces différentes échelles temporelles et spatiales démontrent que la composition bactérienne varie en fonction de la profondeur et de la saison (Pernthaler et al., 1998; Comte et al., 2005).

#### 2.1.9.1.4. L'influence de l'hétérogénéité micro-environnementale

Qu'il s'agisse de facteurs biotiques ou abiotiques, il apparaît que **l'hétérogénéité micro-environnementale** des habitats favorise l'établissement d'une plus grande biodiversité. Cette hétérogénéité peut être spatiale ou temporelle. C'est ainsi que les sols et les sédiments sont reconnus comme ayant généralement une diversité supérieure à celle des milieux aquatiques (Nold et Zwart, 1998; Torsvik et al., 2002; Curtis et Sloan, 2004). Les travaux de Zhou et al. (2002) et ceux de Korona et al., (1994) montrent que la présence de "patch" ou de complexité dans l'environnement peut maintenir une plus grande diversité par rapport à des milieux similaires mais plus homogènes. Pour Horner-Devine et al. (2004) il existe une corrélation positive entre la taille de l'aire échantillonnée et le nombre d'espèces trouvées dans cette aire, ceci en raison de l'hétérogénéité environnementale qui augmente généralement avec l'aire. Dans les milieux aquatiques, la diversité bactérienne peut être supérieure à l'interface des compartiments "sédiments-eau" et à l'interface de couches oxiques et anoxiques du fait de

gradients environnementaux qui offrent une plus grande diversité en terme d'habitat (Coyne, 1999; Madigan et al., 2000).

#### 2.1.9.1.5. L'influence des perturbations

Une perturbation (angl. : disturbance) inclut d'une part tout événement discret susceptible de perturber un écosystème, de perturber la structure d'une communauté et d'une population et d'autre part tout événement discret capable de modifier les ressources, la disponibilité d'un substrat ou de l'environnement physique (Pickett et White, 1985). Les perturbations sont des processus pouvant influencer la diversité des animaux et des plantes. Connell suggère ainsi que la diversité est maximale quand les intensités des perturbations sont intermédiaire et propose "the intermediate disturbance hypothesis" (Connell, 1978). Cette hypothèse pourrait expliquer "le paradoxe du plancton", décrit par Hutchinson dans les années 60 (1961) alors que la théorie de l'exclusion compétitive (Hardin, 1960) voudrait qu'un nombre limité d'espèces dominant un environnement aquatique *a priori* homogène. Les travaux de Huisman et Weissing ont montré que la compétition entre espèces phytoplanctoniques pour les mêmes ressources peut générer des oscillations et des fluctuations chaotiques de l'abondance de chacune des espèces et que ce sont ces fluctuations et perturbations qui favorisent la coexistence de plusieurs espèces et donc une plus grande biodiversité (Huisman et Weissing, 1999; Huisman et Weissing, 2001a; Huisman et Weissing, 2001b).

Aujourd'hui l'hypothèse des perturbations intermédiaires a été testée et acceptée pour un ensemble d'environnements et de groupes biologiques. Ainsi, Floeder et Sommer (1999) l'ont validé pour des communautés phytoplanctoniques. L'hypothèse des perturbations intermédiaires semblerait être également applicable aux communautés bactériennes, comme le montrent divers travaux effectués en laboratoire. Ainsi, des cultures de *Pseudomonas fluorescens*, exposées à une gamme de concentration de nutriments, montrent une relation unimodale entre diversité et productivité (Kassen et al., 2000). Cette relation unimodale serait due à une compétition niche-spécifique. Les effets des perturbations (typiquement chimiques) sur la diversité bactérienne ont été également examinés *in situ*. A titre d'exemple nous citons la revue de Johnsen et al. (2001) et les travaux de Kozdroy et Van Elsas (2001) en ce qui concerne les effets de perturbations chimiques sur la diversité de communautés bactériennes dans des sols. Les travaux de Bruce et al. (1995) montrent qu'un site moyennement exposé au mercure présente une grande diversité des gènes impliqués dans la résistance au mercure, et au contraire que les sites faiblement ou fortement exposés au mercure, ont une diversité plus

faible. Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse des perturbations intermédiaires. Cependant, les conclusions des travaux *in situ* restent difficiles à interpréter, car souvent les effets des perturbations peuvent être confondus avec les effets d'autres facteurs tels que la structure du sol, la couverture végétale, etc...

De façon générale, les fluctuations sont de deux types : les fluctuations générées par des facteurs externes, tels que les oscillations dans la disponibilité de nutriments (Sommer, 1985) et les fluctuations causées par des systèmes de feedback internes (Armstrong et McGhee, 1976) tels que la prédation, la lyse virale, la compétition pour les éléments nutritifs et pour certains systèmes la reproduction (Scheffer et al., 2003). En ce qui concerne les communautés aquatiques microbiennes et notamment bactérienne, il a été proposé que l'infection virale de ces communautés pourrait en partie expliquer le paradoxe du plancton (Fuhrman et Suttle, 1993 ; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). La nature spécifique de l'infection virale, combinée à la dépendance de l'infection à la densité de la population hôte, pourrait être envisagée comme facteur explicatif de la mortalité de certaines espèces au delà d'une certaine densité. Plus une population bactérienne est abondante, plus elle s'expose à la lyse virale ; le virus exerce un contrôle de l'espèce dominante, phénomène connu comme l'hypothèse du « killing the winner » (Thingstad et Lignell, 1997). Cette hypothèse a été vérifiée mais aussi contredite à différentes reprises depuis (voir plus bas).

### **2.1.9.2. Les mécanismes influant la composition de la communauté bactérienne à l'échelle locale et régionale**

Actuellement les écologistes sont en désaccord sur les mécanismes qui peuvent influencer la composition de la communauté bactérienne à l'échelle locale. Est-ce que le concept de biogéographie peut être appliqué aux bactéries de la même façon que pour les plantes et les animaux, autrement dit, la question s'est posée de savoir s'il existe des espèces endémiques à certaines régions géographiques ou si toutes les espèces bactériennes sont cosmopolites? C'est ainsi que deux concepts sont souvent opposés : 1) le concept d'ubiquité et 2) le concept de métacommunauté.

#### 2.1.9.2.1. Le concept d'ubiquité

Historiquement, le **concept d'ubiquité** vient de la déclaration de Baas-Beckings (1934) : "Everything is everywhere, the environment selects". Le concept d'ubiquité pourrait être applicable aux microorganismes si l'on considère un certain nombre de

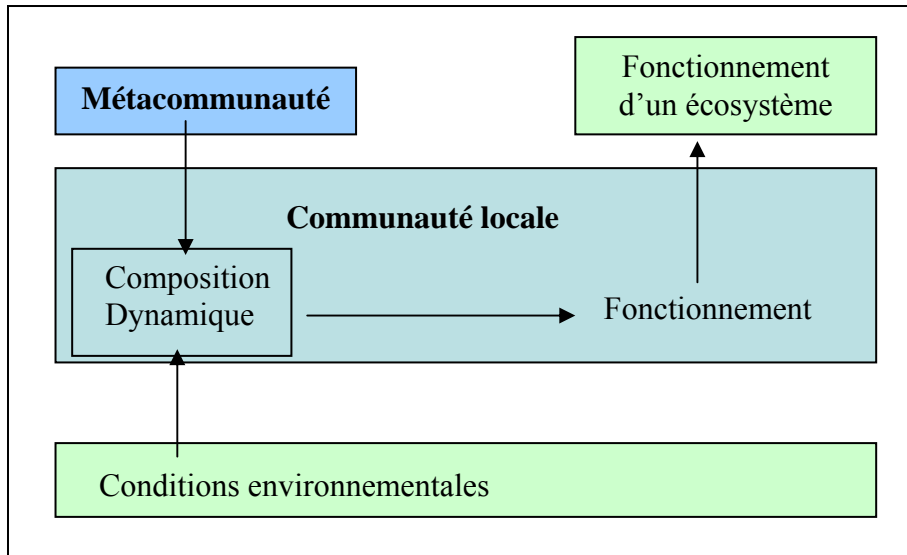


caractéristiques favorisant leur dispersion : leur faible taille, leur taux de renouvellement rapide, leur plasticité métabolique et leur abondance. A ces caractéristiques s'ajoute un faible taux d'extinction (Whitman et al., 1998). Ainsi, la distribution de bactéries et d'autres organismes microbiens peut être considérée en théorie, comme étant indépendante des barrières géographiques (Finlay, 2002). De plus, le concept d'ubiquité suppose l'existence d'un pool commun de bactéries présentes dans tous les milieux, même si certaines des bactéries du pool ne sont pas actives d'un point de vue métabolique. Les conditions environnementales sélectionnent certains taxa plutôt que d'autres au sein de ce pool commun. D'une certaine manière, cette idée d'ubiquité a été confirmée par l'existence de clusters cosmopolites de séquences d'ARNr 16S (Glöckner et al., 2000; Zwart et al., 2002; Hahn, 2003). L'hypothèse de biogéographie (la biogéographie est la distribution géographique d'organismes dans le temps et l'espace), qui s'applique aux plantes supérieures et aux animaux, a cependant été démontrée pour certains groupes microbiens, même si elle reste une hypothèse controversée. Ainsi, l'existence de différenciations biogéographiques a été mise en évidence à la suite de travaux réalisés sur certains taxa ou sur certaines espèces bactériennes. A titre d'exemple, nous citerons les travaux de Cho et Tiedje (2000) sur le genre *Pseudomonas*, ceux de Gugger et al. (2005) sur le genre *Cylindrospermopsis* et ceux de Whitaker et al. (2003) sur le genre *Sulfolobus*. Les travaux de Fulthorpe et al. (1998) concernant la caractérisation génétique d'un ensemble de bactéries, isolées à partir d'échantillons de sol de six régions différentes et qui ont toutes la capacité de dégrader le 3-chlorobenzoate, montrent une forte endémicité parmi les géotypes isolés, parfois due au type de végétation environnante. Les travaux de Papke et al. (2003) ont montré que les patrons phylogénétiques observés dans une communauté de cyanobactéries de sources chaudes était corrélés à la distribution géographique des cyanobactéries, plutôt qu'aux conditions chimiques. Cette étude montre clairement que la structure locale d'une communauté est influencée par des caractéristiques géographiques (probablement en résultat d'une dispersion restreinte) et pas par les conditions environnementales locales. Un travail très intéressant a été fourni par Taylor et al. (2005) qui ont examiné la variabilité géographique de la diversité des bactéries libres et celle des bactéries associées à une éponge marine. La forte ressemblance des communautés bactériennes libres, indépendamment de la région géographique d'origine, appuie l'hypothèse de l'ubiquité (Baas-Beckings, 1934), alors que les différences de diversité observées en examinant les communautés bactériennes associées aux éponges indiquent plutôt l'existence d'endémisme chez cette fraction de bactéries. Enfin, une étude effectuée sur 30 lacs américains, a montré que le niveau de diversité des communautés bactériennes était fonction

de la latitude (Yannarell et Triplett, 2005). Pour conclure sur ce sujet, il convient de réfléchir au fait que la réponse à la question d'ubiquité des microorganismes dépend peut être et surtout de la résolution phylogénétique choisie (Cho et Tiedje, 2000). Enfin, notons que dans ce concept d'ubiquité, les conditions environnementales locales sont les facteurs majeurs qui interviennent dans la régulation de la composition d'une communauté bactériennes.

#### 2.1.9.2.2. Le concept de métacommunauté

Le **concept de métacommunauté** est en opposition avec le concept d'ubiquité (Curtis et Sloan, 2004). Dans ce concept, une communauté locale (*ex.* : les communautés bactériennes d'un lac) n'est pas vue comme une entité isolée et fermée sur elle même, mais comme une entité influencée et formée par des processus régionaux (voir Leibold et al., (2004)) (Fig.6.). Une métacommunauté peut être définie comme un ensemble de communautés locales liées entre elles par la dispersion de certaines espèces. La dispersion agit ici comme un facteur homogénéisant qui augmente la similarité entre les communautés locales au sein d'une région (ou métacommunauté). Curtis et Sloan (2004) suggèrent que la composition de la communauté bactérienne est le fruit d'événements se produisant au hasard, en relation avec le recrutement de bactéries spécifiques du pool d'espèces régional environnant. Dans ce concept, une bactérie caractérisée par une certaine fonction au sein d'une communauté locale n'est pas la seule à pouvoir effectuer cette fonction mais la première qui a pu occuper cette niche écologique. Si des phénomènes d'extinction interviennent sur cette bactérie, d'autres espèces bactériennes du même groupe fonctionnel (notion de redondance) pourront occuper cette niche. Contrairement au concept d'ubiquité, dans le concept de métacommunauté la composition d'une communauté bactérienne est le fruit du hasard. Trois processus majeurs sont responsables de la création du patron biogéographique : la dispersion, la spéciation et l'extinction (revue par (Horner-Devine et al., 2003a)).

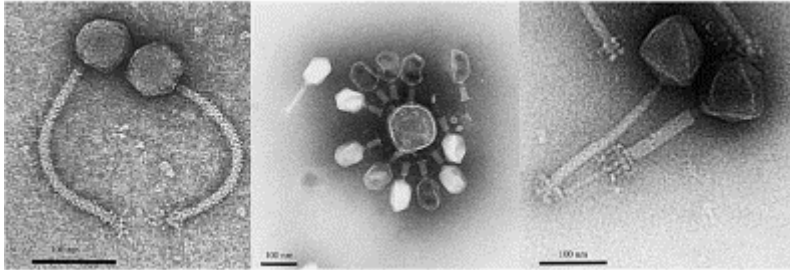


**Fig.6.** La composition de la communauté et la dynamique des populations sont influencées d'une part par des processus locaux (ex. : conditions environnementales) et des processus régionaux (ex. : appelé la métacommunauté), et déterminent le fonctionnement de communautés locales, ainsi que de l'écosystème. D'après Langenheder (2005).

## 2.2. Les virus et les bactériophages en particulier

L'existence des **virus** a été découverte grâce à un chercheur allemand (Adolf Mayer) à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Le terme virus signifie poison en latin. Ils se différencient des autres microorganismes par leur mode de reproduction, qui est basé sur la réplication de leur matériel génétique dans une cellule hôte, et par leur structure particulière. Ce sont des parasites obligatoires. Les virus qui infectent les cellules bactériennes sont appelés **bactériophages** ou phages (Fig. 7). Les recherches entreprises jusqu'ici montrent que la majorité des virus dans la biosphère sont des bactériophages, il s'agit donc du plus grand groupe viral, ce qui n'est pas étonnant sachant 1) que les bactéries sont les organismes hôtes les plus abondants et 2) qu'en général il existe pour chaque hôte au moins un virus spécifique. Entre 1959 et 2003, plus de 5.300 bactériophages ont été observés et décrits par microscopie électronique (Ackermann, 2003). Les **cyanophages**, autrement dit les virus qui infectent les cyanobactéries, sont des virus proches des bactériophages, mais qui semblent avoir évolué de façon indépendante (Padan et Shilo, 1973; Proctor et Fuhrman, 1990; Suttle, 2000c; Suttle, 2000a; Sullivan et al., 2003). Enfin, des **virus à microorganismes eucaryotes** existent

comme le montrent diverses études en milieu aquatique (Chen et Suttle, 1996, Brüssow et al., 2004; Suttle, 2000b; Nagasaki et al., 2004).

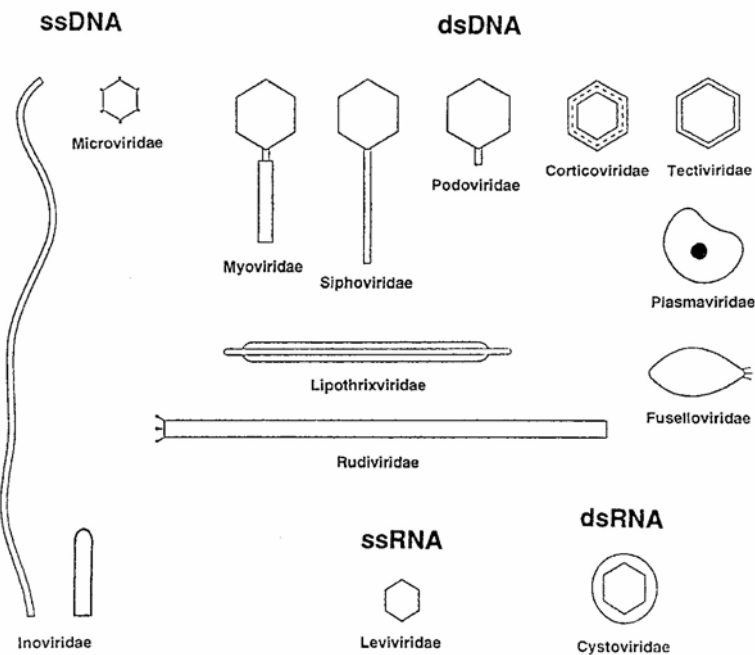


**Fig.7.** Photos de bactériophages ; au centre des bactériophages entourant une cellule d'*Escherichia coli*. L'échelle correspond à 100 nm. Extrait de Brüssow et Hendrix (2002).

### **2.2.1. Taille, organisation structurale et forme**

La **taille** des virus est comprise en général entre 18 et 400 nm. Toute particule virale est constituée d'acide nucléique (ADN ou ARN), entouré par une coque, appelée capside. Les acides nucléiques sont de deux types, soit à ARN, soit à ADN double ou simple brin. La capsid est constituée de protéines seules ou combinées à des glucides et est parfois entourée d'une membrane plasmique provenant de la cellule hôte qui a "produit" la particule virale. La capsid a comme fonction primaire de protéger le génome du virus lorsque le virion se trouve à l'extérieur de la cellule hôte et comme fonction secondaire de porter les déterminants viraux qui se lient de manière spécifique aux récepteurs de la cellule hôte. Deux grands types de structure de capsid existent : les capsides à symétrie hélicoïdale et les capsides à structure icosaédrique (cubique). De plus, les particules virales peuvent être équipées d'une queue mobile, ou non, courte ou longue, ou au contraire en être dépourvu. 96% de tous les bactériophages sont des phages à queue, appelés **Caudovirales** ; les 4% restants sont à forme cubique ou filamenteuse ou sont pléiomorphes (Fig. 8 et Tab. 2). Sur la base des caractéristiques morphologiques de leur queue, les *Caudovirales* sont divisés en *Myoviridae* (possédant une queue contractile), en *Siphoviridae* (queue longue non contractile) et en *Podoviridae* (queue courte non contractile) (Ackermann, 2001 ; Brüssow et Hendrix, 2002 ; Ackermann, 2003). Ces trois morphotypes constituent 25, 61 et 14% des *Caudovirales*. L'étude morphologique la plus complète ayant été effectuée en milieu aquatique, a été effectuée sur le Lac Plußsee et a confirmé la présence des trois morphotypes (*Myo*-, *Sipho*- et *Podoviridae*) au sein de cet écosystème (Demuth et al., 1993).

Les cyanophages sont tous des phages à double brin d'ADN et ils regroupent des représentants appartenant aux trois familles de phages à queue décrites ci-dessus (*Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae*). Chaque famille contient des représentants qui infectent des cyanobactéries filamenteuses et unicellulaires (revue par Suttle (2000a)). Différentes études ont mis en évidence que certaines formes prévalent dans certains types d'écosystèmes. Il apparaît en fait, qu'en mer les *Myoviridae* spécifiques à *Synechococcus* semblent être les plus couramment isolés et les plus abondants ( $>10^6 \text{.mL}^{-1}$ ) (Suttle et Chan, 1993; Wilson et al., 1993; Lu et al., 2001; Ortmann et al., 2002; Marston et Sallee, 2003; McDaniel et Paul, 2005), alors qu'en eau douce prédomineraient les *Podoviridae* et les *Siphoviridae* spécifiques à diverses espèces de cyanobactéries plutôt filamenteuses (Suttle, 2000a).




**Fig. 8.** Représentation schématique des groupes majeurs de phages. D'après Ackermann (2003). Consulter Tab. 2. pour les codes d'identifications.

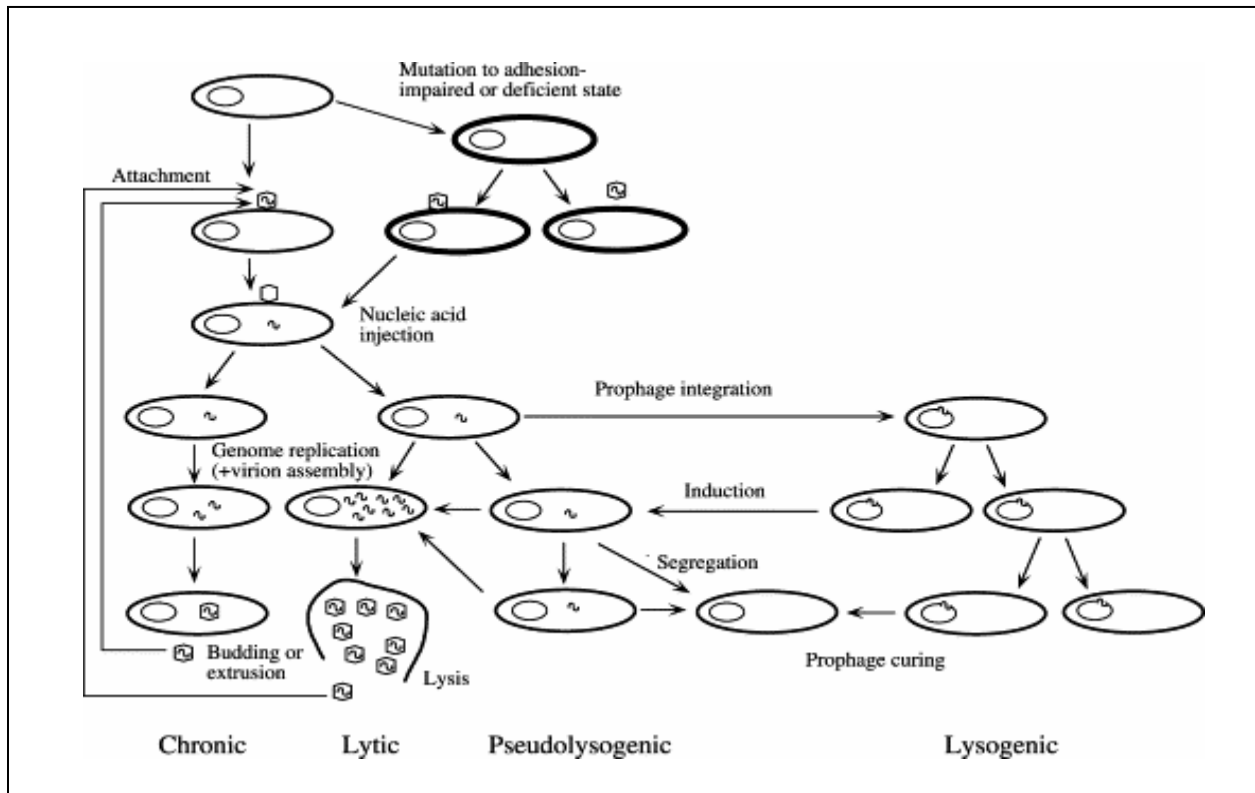
**Tab.2.** Classification et caractéristiques basiques des bactériophages. C : circulaire ; L : linéaire, S : segmenté ; T : superhélicoïdale ; ss : brin d'ADN simple ; ds : double hélice. D'après Ackermann (2003).

| Forme       | Type d'acide nucléique                                    | Ordres et familles  | Genres                | Exemples                          | Membres                     | Caractéristiques                                 |
|-------------|---|---|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--|
| A queue     | DNA, ds, L  | Caudovirales<br>Myoviridae<br>Siphoviridae<br>Podoviridae                     | 15<br>6<br>6<br>3     | T4<br>Lamba<br>T7                 | 4950<br>1243<br>3011<br>696 | Queue c.<br>Queue longue, non c.<br>Queue courte |
| Polyédrique | DNA, ss, C<br>ds, C, T<br>ds, L<br>RNA, ss, L<br>ds, L, S | Microviridae<br>Corticoviridae<br>Tectiviridae<br>Leviviridae<br>Cystoviridae | 4<br>1<br>1<br>2<br>1 | ΦX174<br>PM2<br>PRD1<br>MS2<br>Φ6 | 40<br>3?<br>18<br>39<br>1   | Capside complex<br>Vésicule interne<br>Envelope  |
| Filamenteux | DNA, ss, C<br>ds, L                                       | Inoviridae<br>Rudiviridae   | 2<br>2                | fd<br>SIRV1                       | 57<br>8?                    | Filaments ou bâtonnets                           |
| Pleiomorphe | DNA, ds, C, T<br>Ds, C, T                                 | Plasmiviridae<br>Fuselloviridae   | 1<br>1                | L2<br>SSV1                        | 6<br>8?                     | Envelope, sans capsid<br>Pas de capsid           |

### 2.2.2. Modes de reproduction des bactériophages

Comme le sont tous les virus, les bactériophages sont des **parasites obligatoires** et intracellulaires. Ils sont spécifiques d'un hôte (en angl. : host-specific) (Bratbak et al., 1994). Leur multiplication est dépendante des cellules qu'ils infectent. L'infection commence avec la fixation ou l'adsorption du virus aux récepteurs présents à la surface de la cellule hôte et continue avec l'injection de l'acide nucléique viral dans la cellule hôte. Une fois dans cette cellule, le virion peut être à l'origine d'un cycle de type virulent (ou lytique), tempéré (ou lysogénique), pseudolysogénique ou moins souvent chronique (Fig. 9.) (Fuhrman et Suttle, 1993 ; Sime-Ngando, 1997). Au cours d'un cycle lytique, le génome viral est répliqué et les différents constituants viraux vont encapsider le génome viral afin de former des néovirus qui seront libérés dans l'environnement par lyse de la cellule hôte. Au cours d'un cycle lysogénique, on assistera à la formation d'un provirus, c'est à dire que le génome viral va s'intégrer au génome de la cellule hôte. Le provirus se reproduira avec l'ADN de son hôte et sera transmis aux générations futures. L'induction d'un cycle lytique peut avoir lieu de façon spontanée (en absence de facteurs spécifiques d'induction) ou être provoquée notamment par des facteurs de "stress", tels que les rayons UV, les chocs thermiques etc. Le cycle chronique est identique à un cycle lytique, sauf qu'il n'y aura pas de lyse de la cellule hôte ; les néovirus seront expulsés de la cellule hôte par bourgeonnement ou par extrusion de filament. Enfin, au cours d'un cycle pseudolysogénique, l'ADN du phage ne s'intègre pas à l'ADN de l'hôte et sera distribué dans la progéniture de la cellule hôte. La proportion de cellules lysogéniques varie

en fonction des communautés bactériennes étudiées (Wilcox et Fuhrmann, 1994; Weinbauer et Suttle, 1996; Wilson et Mann, 1997; Ortmann et al., 2002). Il semble que la production virale de type lytique soit prépondérante dans les écosystèmes aquatiques, notamment dans les eaux riches en nutriments, en particulier lors de blooms du plancton et dans la couche trophogène (Sime-Ngando, 1997). Inversement, la production virale de type lytique semble être défavorisée dans des systèmes à faible densité de te où lorsque ce dernier n'est pas favorisé par son environnement (Wommack et Colwell, 2000).



**Fig.9.** Représentation schématique des principaux types de cycles de vie de virus, et notamment des bactériophages. Image d'après Weinbauer (2004).

### 2.2.3. Ubiquité et nombre total de virus sur Terre

Les virus en général, et les bactériophages en particulier, sont probablement **ubiquistes**. En fait, dans la plupart des écosystèmes où leur étude a été entreprise, des virus ont été mis en évidence. Ainsi, ils ont été trouvés en eau douce et marine (Wommack et Colwell, 2000; Borsheim, 1993), en milieu terrestre (Williamson et al., 2005), dans les sédiments (Duhamel et Jacquet, 2005), mais aussi dans des milieux extrêmes tels que les

milieux alcalins et/ou hypersalins (Pedrós-Alió et al., 2000; Jiang et al., 2004) et les sources d'eau chaude (angl. : hot-spring) (Breitbart et al., 2004b).

Quel est le **nombre total** de bactériophages sur Terre ? Pour répondre à cette question, un certain nombre de données doivent être pris en compte : 1) le nombre de bactéries sur Terre et 2) le nombre moyen de bactériophages par cellule bactérienne. Concernant le premier point, Whitman et al. (1998) ont estimé à  $10^{30}$  le nombre total de bactéries sur Terre. Concernant le deuxième point, nous assumons un nombre moyen de 10 bactériophages par cellule bactérienne. D'une façon générale, dans les échantillons naturels pélagiques, on trouve en moyenne entre 2 à 10 fois plus de virus que de bactéries, même si ce nombre peut occasionnellement être  $< 1$  ou  $> 50$ . Dans des eaux riches en nutriments, le rapport entre virus et bactéries augmente en général (revue par Wommack et Colwell (2000)).

Nous pouvons donc extrapoler de ces données le nombre total de bactériophages (Angly et al., 2005). Rohwer et Edwards ont estimé ainsi le nombre total de virus sur Terre à  $10^{31}$  (Rohwer et Edwards, 2002) ; les virus et donc les bactériophages seraient donc le groupe biologique le plus abondant sur Terre. Le nombre de *Caudovirales*, la forme majoritaire chez les bactériophages, a été estimé par Bruessow et Hendrix (2002) à plus de  $10^{30}$ .

Compte tenu que le plus grand nombre de bactéries se trouve dans les sédiments océaniques et dans les sols (Whitman et al., 1998) et que les abondances des virus sont directement corrélées à l'abondance de l'hôte comme cela a été démontré par exemple par Suttle (2000d) dans le cas des cyanophages, nous pouvons donc supposer que la majorité des bactériophages se trouvent dans les sédiments océaniques et les sols (Middelboe, 2005).

#### **2.2.4. Abondance en milieu aquatique et facteurs de régulation**

L'introduction de nouvelles méthodes de comptage de virus a permis d'acquérir des informations quant à l'**abondance** virale dans les eaux naturelles. La découverte de fortes abondances de virus aquatiques appartient à Torrella et Morita (1979) qui comptèrent par microscopie électronique plus de  $10^4$  particules virales par mL d'eau dans la baie de Yaquina (Oregon). Une dizaine d'années plus tard, Sieburth et al. (1988) comptèrent cette fois-ci par microscopie à épifluorescence avec une coloration DAPI,  $6 \times 10^6$  particules virales par mL d'eau. Depuis, de nouvelles données ont été obtenues au moyen de la microscopie électronique à transmission (Bergh et al., 1989; Proctor et Fuhrman, 1990) qui est de moins en moins utilisé au profit de la microscopie à épifluorescence (Hara et al., 1991). Cette dernière technique est encore couramment utilisée (Hennes et Suttle, 1995; Noble et Fuhrman, 1998),



même si la cytométrie en flux, technique plus récente, a considérablement facilité le comptage de virus (Marie et al., 1999; Brussard et al., 2000; Vives-Rego et al., 2000; Chen et al., 2001; Brussard, 2004).

Ainsi, il est apparu que les virus constituent le groupe biologique le plus abondant en milieu aquatique, puisque leur abondance est typiquement comprise entre  $<10^5$  et  $>10^8$  particules par millilitre (Bergh et al., 1989; Bratbak et al., 1994; Maranger et Bird, 1995; Wommack et Colwell, 2000). La variabilité de l'abondance virale selon une échelle spatio-temporelle suggère une relation forte entre l'abondance virale et les deux principaux facteurs qui affectent l'abondance bactérienne : la charge en matière organique dissoute et la température (Sime-Ngando, 1997). En fait, l'abondance des virus est généralement plus élevée au printemps et en été (Bettarel et al., 2003a ; Farnell-Jackson et Ward, 2003), en zone côtière qu'en zone pélagique marine (Boehme et al., 1993; Paul et al., 1993) et enfin dans la couche trophogène que dans la couche tropholytique océanique (Boehme et al., 1993; Cochlan et al., 1993). Des exceptions à cette règle, existent cependant (Personnic S., communication personnelle).

Dans des écosystèmes aquatiques naturels, **l'abondance virale dépend de la production de nouvelles particules virales et du devenir de ces particules.** La production de nouvelles particules peut être initiée par l'infection d'une cellule hôte sensible par un virus lytique ou alors par l'activation (induction) du génome viral porté par une cellule hôte lysogénique ou pseudolysogénique. Le nombre de particules virales produites par cellule infectée s'appelle la charge virale (angl. : **Burst size**). Ce nombre est important dans les calculs de production virale pour estimer l'importance relative de la mortalité induite par infection virale. En prenant en compte des échantillons d'eau douce et marine, la valeur moyenne de "burst size" est de 24 phages par cellule bactérioplanctonique (revue par Wommack et Colwell (2000)). Le devenir de ces nouvelles particules libérées par la cellule hôte, dépend du succès de l'infection qui dépend elle-même de la densité des cellules hôtes et augmente avec le nombre de cellules sensibles dans le milieu. Lorsque il n'y a pas de rencontre avec une cellule hôte sensible, les virus subissent alors une destruction rapide par des facteurs biotiques (exo- et ectoenzymes, broutage, mécanismes de résistance de la cellule hôte,..) et/ou abiotiques (rayonnement ultraviolet, température, agents chimiques, adsorption sur des particules inertes) (Kapusinski et Mitchell, 1980; Suttle et Chen, 1992; Suttle, 2000a). Compte tenu de la demi-vie d'une particule virale d'environ 36 heures (revue par Wommack et Colwell (2000)) et des densités virales élevées et relativement constantes, il est probable que la prolifération virale en milieu pélagique soit très rapide, même en présence de

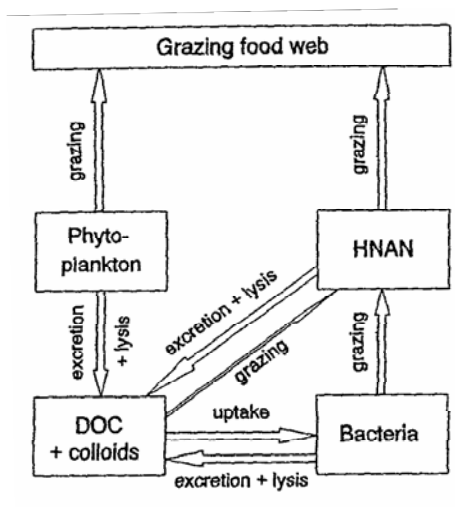
faibles densités d'hôte spécifique (Kokjohn et al., 1991).

### 2.2.5. Rôle fonctionnel des bactériophages en milieu aquatique

Les études concernant le rôle des virus ont mis en évidence que ceux-ci occupent un **rôle important** dans les processus microbiens impliqués dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques (Fuhrman et Suttle, 1993; Fuhrman, 1999; Wilhelm et Suttle, 1999; Wommack et Colwell, 2000; Weinbauer, 2004; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004).

#### 2.2.5.1. Flux de matière

La vision de la chaîne alimentaire (phytoplancton → mesozooplancton → planctonophages → piscivores) classique a été révolutionnée par Pomeroy (1974) et finalisée par Azam et al. (1983) qui ont montré l'importance et le rôle des communautés bactériennes dans le recyclage de la matière organique. Ce nouveau paradigme a été appelé par Azam et al. (1983) "the microbial loop" (la **boucle microbienne**), où la plus grande quantité de carbone produite par le phytoplancton sous forme de COD est assimilée par les bactéries qui sont ensuite broutées par des protistes hétérotrophes flagellés. Ce processus permet un recyclage important de la matière organique résultant de la production primaire vers les niveaux trophiques supérieurs. La découverte d'abondantes quantités de virus dans tous les écosystèmes aquatiques a eu un impact immédiat sur ce concept de boucle microbienne. La figure 10 montre qu'en provoquant la lyse des cellules, les virus interviennent sur le flux du carbone au niveau de chaque niveau trophique microbien en transformant la matière particulaire en matière dissoute (Bratbak et al., 1994).



**Fig.10.** Boucle microbienne et effets des virus (« lysis »). Voir texte pour plus de détails. D'après Bratbak et al. (1994).

La lyse virale influence non seulement le flux du carbone mais aussi le flux d'azote et de phosphore. En fait, la lyse virale s'accompagne d'un enrichissement du milieu environnant en matière organique riche en C, P et N, essentiellement constituée de particules virales, de débris organiques, de constituants cellulaires et de molécules diverses; il s'agit en résumé de matière organique dissoute ( $< 0,45 \mu\text{m}$ ). La production virale lytique peut ainsi influencer le fonctionnement et le rendement des réseaux trophiques microbiens et des chaînes alimentaires aquatiques, à travers la boucle trophique bactéries  $\rightarrow$  bactériophages  $\rightarrow$  MOD  $\rightarrow$  bactéries (Middelboe et al., 1996). Ceci est lié au fait que la lyse virale des bactéries contribue au recyclage des nutriments (C, N, P), qu'elle réduit la contribution de la production bactérienne aux flux de matière et d'énergie vers les maillons trophiques supérieurs et qu'elle peut paradoxalement être à l'origine d'une forte production bactérienne, en l'absence d'un accroissement de la production primaire. Enfin, les impacts potentiels des activités virales sur les cycles des nutriments en milieu océanique ont été revus par Wilhelm et Suttle (1999). Ces auteurs estiment que le pourcentage de carbone produit par les bactéries et perdu suite à la lyse virale est compris entre 8 et 42% au large et entre 6,8 et 25% en zone côtière.

Il faut aussi signaler que le rôle des virus comme maillon trophique en milieu aquatique en tant que source de nourriture pour le protozooplancton, semble être négligeable en raison de leur faible taille et malgré leur forte abondance (Bettarel et al., 2005).

#### **2.2.5.2. Contrôle des populations hôtes**

Compte tenu, d'une part de leur mode de vie (infection avec mort de l'hôte spécifique) et d'autre part, de leur abondance en milieu aquatique (Bergh et al., 1989), les virus ont un impact quantitatif et qualitatif notable sur les populations hôtes (contrôle de populations) (Sime-Ngando, 1997; Wilhelm et Suttle, 1999; Weinbauer, 2004; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). En ce qui concerne leur impact quantitatif (mortalité de l'hôte) dans les eaux superficielles, la lyse virale est un processus biologique qui peut expliquer entre 10 et 50% de la mortalité journalière des bactéries (Fuhrman, 1999). De la même manière, les premiers résultats acquis au laboratoire de l'INRA de Thonon ont mis en évidence que les virus du lac du Bourget pouvaient être responsables à hauteur de 50% de la mortalité bactérienne en l'absence d'autres prédateurs (Jacquet et al., 2005b). Enfin, ils affectent les communautés biologiques d'un point de vue qualitatif. Ils influencent en effet la diversité et la composition d'une communauté en privilégiant l'infection et la mortalité de leurs hôtes

(espèces) spécifiques (Lenski et Levin, 1985; Fuhrman et Suttle, 1993; Bratbak et al., 1994; Wommack et al., 1999).

Les virus interviennent également dans le transfert du matériel génétique au niveau de la population hôte (Bratbak et Heldal, 1995; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). Les virus peuvent permettre l'échange de matériel génétique entre deux bactéries hôtes via le phénomène de transduction (Levison et al., 1987 ; Miller, 1988; Chiura, 1997; Paul, 1999). Ainsi, les virus influencent l'ensemble des processus biogéochimiques et biologiques en milieu pélagique en jouant non seulement un rôle dans le recyclage de l'énergie et de la matière organique, mais aussi un rôle dans l'évolution des hôtes (Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004).

### **2.2.5.3. Contrôle des populations de cyanophages ou d'autres espèces phytoplanctoniques impliquées dans la formation de blooms**

Une large proportion des travaux menés sur les virus aquatiques concerne les **cyanophages**. Cela est du d'une part à la présence ubiquiste de leurs hôtes, les cyanobactéries, en mer et en eau douce (Suttle, 2000a), et d'autre part à leur abondance et leur importance dans ces milieux. En milieu marin, deux genres de cyanobactéries sont particulièrement abondants : *Synechococcus* et *Prochlorococcus* (Partensky et al., 1999). Leur contribution conjointe à la production primaire en milieu marin oligotrophe est comprise entre 32% et 89% (Gorick et Welschmeyer, 1993; Li, 1995; Liu et al., 1997a; Veldhuis et al., 1997). En milieu aquatique d'eau douce, les proliférations de cyanobactéries, liées à une dégradation de la qualité des eaux (eutrophisation), causent des dommages économiques et écologiques croissants (Christoffersen, 1996; Chorus et al., 2000; Dokulil et Teubner, 2000; Briand et al., 2004), d'où l'intérêt de la part des scientifiques pour l'étude des cyanophages comme agents de contrôle biologique potentiels de ces proliférations (Suttle, 2000a). Les travaux de Proctor et Fuhrman (1990) et de Suttle (2000a) ont mis en évidence que la lyse virale peut être une cause importante de mortalité non seulement des bactéries hétérotrophes mais aussi des cyanobactéries, alors qu'avant la mortalité des cyanobactéries était attribué au seul broutage par le zooplancton (Fenchel, 1982; Sherr et Sherr, 1987). Par ailleurs, Sieburth et al. (1988) présumaient que les virus avaient un impact plus élevé sur la structure génétique que sur leur abondance. Depuis, différents travaux appuient l'hypothèse d'un contrôle virale de certains blooms planctoniques. Par exemple, des travaux effectués dans un lac eutrophe, ont mis en évidence le déclin d'une population de cyanobactéries en parallèle à un pic d'abondances de

virus (Gons et al., 2002). Le développement de virus en forte densité lors de la prolifération de certaines espèces phytoplanctoniques marines a été observé également par d'autres auteurs (Bratbak et al., 1990; Brussaard et al., 1996; Jacquet et al., 2002; Nagasaki et al., 2004).

### **2.2.6. Diversité taxinomique des bactériophages**

A l'heure actuelle nous n'avons pas d'estimation de la diversité spécifique des bactériophages sur Terre. Il semblerait que la diversité virale soit en tout cas supérieure à celle des bactéries. (Consulter 2.2.6.2.).

#### **2.2.6.1. Les techniques basées sur la mise en culture**

Les approches qui sont basées sur la mise en culture de virus utilisent la procédure classique de "formation de plaques" (angl. : « **Plaque Assay** »). Tout d'abord, l'hôte est cultivé dans un milieu de culture liquide, puis il est mélangé à l'échantillon contenant le virus à étudier. Ce mélange est ajouté à de l'agar et l'ensemble est coulé dans une boîte de culture. Si le phage est capable d'infecter l'hôte, alors la lyse de l'hôte aura comme conséquence la formation d'une zone plus claire dans la boîte de culture. Cette zone plus claire est appelée "plaque". Grâce à cette technique il a pu être démontré qu'au moins un, mais en général plusieurs virus sont capables d'infecter un hôte (Suttle et Chan, 1993; Sullivan et al., 2003). Ce genre d'approche limite cependant de façon considérable l'étude de la diversité virale, car la plupart des microorganismes hôtes, tels que les bactéries, ne sont pas cultivables en laboratoire.

#### **2.2.6.2. Les techniques biomoléculaires**

Les approches qui ne requièrent pas la mise en culture des virus afin d'en étudier la diversité, sont les approches basées sur des informations en provenance du génome viral. **En général, les approches génétiques sont basées soit sur l'analyse d'un gène conservé préalablement amplifié par PCR, soit sur l'analyse du génome entier.** Ces études de diversité génétique virale ont été pour la plupart d'entre elles, effectuées en milieu marin (*ex.* : (Wichels et al., 1998; Wilson et al., 1999)), et seules deux études, la notre (article IV) et celle de Short et Suttle (2005) traitent à notre connaissance de la diversité de cyanophages en eau douce. La limitation principale des approches génétiques dans le cas de l'étude des virus, est d'obtenir suffisamment d'ADN pour procéder à son analyse (Paul et al., 2002). En fait, la

quantité d'ADN viral dans 100 L d'eau est d'environ 10 µg (Breitbart et al., 2002).

Quant aux **méthodes d'analyses d'un gène conservé**, il est à noter que les virus ne contiennent pas de locus analogue à l'ARN 16S des procaryotes ou à l'ARN 18S des eucaryotes, ce qui rend l'étude de la taxonomie et de la phylogénie des virus dans leur globalité impossible via des approches génétiques basées sur un seul et même gène. Les virus ne peuvent donc être classés sur la base de la séquence d'un marqueur génétique unique (Rohwer et Edwards, 2002). Les analyses sur des génomes entiers ont mis en évidence 1) que le génome viral contient des séquences nucléiques codant pour des protéines structurales (queue, tête,..) ainsi que pour des protéines intervenant dans la réplication d'ADN, dans la transcription, dans l'assemblage d'ADN et dans la lyse de gènes (Bruessow et Hendrix, 2002) et 2) que des séquences conservées d'ADN existent au sein de certains groupes de virus, même si parfois ces séquences spécifiques d'un groupe sont parfois présentes également chez d'autres groupes viraux (Short et Suttle, 2005).

La diversité des cyanophages (des cyanomyophages plus précisément) a été par exemple étudiée en analysant la diversité de séquences d'ADN codant pour une protéine structurale de la capsid virale. Cette séquence d'ADN est relativement conservée chez les cyanophages et elle a été découverte par Fuller et al. (1998). Il s'agit d'une séquence homologue au gène g20 du coliphage T4, qui est probablement le phage le mieux connu (Ackermann et Krisch, 1997). De nouveaux couples d'amorces ciblant cette région chez les cyanophages, ont été définis plus tard (Zhong et al., 2002 ; Short et Suttle, 2005). Pour d'autres groupes de virus, des séquences nucléiques relatives à d'autres protéines structurales ont été proposées. La diversité des virus à microalgues repose sur l'étude du gène codant pour un type de polymérase à ADN, supposé être conservé chez ce groupe de virus (Chen et Suttle, 1996; Chen et al., 1996). Enfin, pour étudier la diversité des virus à *Emiliana huxleyi*, Schroeder et al. (2002) ont proposé des amorces PCR ciblant une protéine majeure de la capsid virale, qui serait spécifique aux virus à *Emiliana huxleyi*.

Diverses techniques, telles que la DGGE (Wilson et al., 2000; Short et Suttle, 2002 ; Short et Suttle, 2005 ), la T-RFLP (Wang et Chen, 2004) et le clonage-séquençage (Wilson et al., 1999) ont été utilisées afin d'analyser la variabilité des gènes « marqueurs » au sein de chaque groupe viral. La grande majorité des séquences trouvées, appartient à des nouveaux sous-groupes qui n'ont pas de représentants cultivés.

Des techniques différentes, telles que les analyses de restriction (RFLP; (Cottrell et Suttle, 1995)), de PFGE (Wommack et al., 1999), d'hybridation (Wichels et al., 1998 ; Jiang et al., 2004), mais aussi de séquençage ont été appliquée aux **études génomiques**, effectuées

soit sur un ensemble d'ADN viral dans un échantillon naturel (Breitbart et al., 2002; Breitbart et al., 2003b) soit sur le génome de virus isolés (Sullivan et al., 2005). Le séquençage d'un génome viral peut poser plusieurs problèmes spécifiques, notamment en raison de la faible abondance d'ADN libre dans l'environnement (DeFlaun et al., 1986; DeFlaun et al., 1987), l'existence de gènes viraux qui provoquent la mort de l'organisme hôte utilisé dans le clonage (Wang et al., 2000) et enfin, de l'ADN viral « non clonable » à cause de modifications de l'ADN lui-même (Warren, 1980). L'âge génomique des virus a commencé en 1977 quand le premier génome viral a été séquencé (Sanger et al., 1977). Le séquençage d'un génome viral est une analyse relativement peu coûteuse et rapide, et par conséquent accessible, en raison de sa faible taille. Plus précisément, la taille du génome des bactériophages est comprise entre 4 kb et 600 kb (Bruessow et Hendrix, 2002), soit 10 à 20 fois moins que la taille moyenne du génome d'une bactérie. Le fait que jusqu'en 2002, une centaine de génomes de bactériophages ait pu être séquencé et publié, illustre bien l'efficacité de cette technique quand elle est appliquée à l'étude génomique des bactériophages.

Les **approches métagénomiques**, appliquées sur l'ensemble de génomes microbiens présents dans un échantillon naturel semblent être particulièrement prometteuses. La technique de « shot-gun » s'est avérée être un outil particulièrement intéressant dans le cadre de ces études (Rohwer et al., 2001; Edwards et Rohwer, 2005). Afin de déterminer la diversité de tous les virus à double hélice d'ADN, Breitbart et al. ont partiellement séquencé des banques de clones de type « shotgun » en provenance de communautés naturelles virales, prélevées dans des eaux de surface marines (Breitbart et al., 2002), dans du sédiment marin (Breitbart et al., 2003a) et dans un échantillon fécal humain (Breitbart et al., 2003b). Plus récemment, Cann et al. (2005b) ont appliqué cette technique de shotgun sur un échantillon fécal équestre. Les analyses réalisées sur ces métagénomes ont mis en évidence que 1) la diversité des communautés virales naturelles, estimée par des modèles mathématiques, était énorme (5.000 génotypes viraux dans 200 L d'eau de mer et 1.000.000 dans 1 kg de sédiment marin) et supérieure à celle des bactéries ; 2) 75% de l'ensemble des gènes présents représentaient des nouveaux gènes, suggérant qu'une large part de la diversité génétique est pour le moment inconnue et que la majorité de virus appartiennent à des nouveaux groupes et n'ont pas de représentants cultivés (Breitbart et Rohwer, 2005).

### **2.2.6.3. Deux systèmes de classifications, deux notions d'espèces ?**

Le système taxonomique actuel concernant les virus est celui de l'**ICTV** (International

Committee on Taxonomy of Viruses). Ce système se base sur la définition d'une espèce virale donnée par van Regenmortel (1990) : "... a polyethic class of viruses that constitutes a replicating lineage and occupies a particular ecological niche". Le concept d'espèce appliqué au virus reste cependant controversé et douteux du fait de l'importance des échanges de gènes d'une particule virale à l'autre (Lawrence et al., 2002). De plus, cette définition requiert non seulement la double mise en culture des cellules hôtes puis celle des virus, mais aussi la mesure de caractères physiques (diamètre de la capsid, présence de queue,..), l'observation de l'organisation du génome virale (taille, type) et de la stratégie de réplication virale (van Regenmortel, 2000). Cet ensemble de critères, rend l'étude de la diversité virale difficile et laborieuse.

Une approche différente au système établi par l'ICTV, a été proposée par Rohwer et Edwards (2002), appelée "**Phage Proteomic Tree**". Cette nouvelle approche est basée sur l'analyse de similarité de 105 génomes viraux, entièrement séquencés. Ce système regroupe des séquences similaires entre elles, et est très utile afin de mettre en évidence des marqueurs génétiques qui peuvent ensuite être utilisés pour suivre la biodiversité virale. Les données fournies par ces techniques ne nous permettent pas de parler d'espèces selon la définition formelle de l'ICTV ; on parlera plutôt de génotypes viraux.

### **2.2.7. Origine de la diversité virale**

Malgré l'abondance remarquable des virus et l'importance de leurs effets potentiels sur le fonctionnement des écosystèmes, la **biodiversité des virus et les processus et facteurs de structuration de celle-ci** en général et celle des bacteriophages en particulier, est très peu connue (Breitbart et al., 2003a). L'état de nos connaissances quant à leur biogéographie et de leur phylogénie est encore plus faible.

#### **2.2.7.1. Influence relative des facteurs biotiques et abiotiques sur la diversité virale**

Si l'on considère que les virus sont spécifiques d'un hôte et que la diversité des hôtes est contrôlée par divers facteurs et processus, on peut aisément supposer que ces mêmes facteurs agissent également sur la diversité virale. C'est ainsi que Øvreås et al. (2003) ont observé en mésocosme des changements de diversité bactérienne et virale suite à l'addition de nutriments. Dans le même esprit, Angly et al. (2005) suggèrent par analyse bioinformatique que la diversité virale est étroitement liée à la diversité de l'hôte spécifique. Pour Lu et al.



(2001), la salinité est un des facteurs qui peuvent influencer la diversité génétique des cyanophages.

Plusieurs travaux de recherche indiquent une distribution hétérogène des populations virales selon la profondeur. En mer, Zhong et al. (2002) ont ainsi montré une augmentation de la diversité de cyanophages avec la profondeur, notamment au niveau de la couche profonde où se trouve la valeur maximale de chlorophylle ("deep chlorophyll maximum layer"). Les résultats de Chen et al. (1996) obtenus sur des communautés de virus marins à microalgues confirment ce résultat. Les changements de diversité virale pourraient être liés aux variations des conditions d'éclairement (intensité, qualité), de la concentration en nutriments et de tout autre facteur intervenant également sur l'hôte. Un certain nombre d'études supplémentaires montre des changements de diversité virale le long de la colonne d'eau, surtout dans des conditions de stratification de l'eau (Wommack et al., 1999) ; le maximum de diversité des cyanophages est observé lorsque la densité de l'hôte est la plus forte (Wilson et al., 1999; Wilson et al., 2000; Wang et Chen, 2004). L'analyse de la communauté virale d'un lac alcalin et hypersalin (Jiang et al., 2004) indique des communautés différentes en surface, à mi-profondeur et au fond. Cette variabilité spatiale verticale de la diversité virale en période de stratification des eaux, est confirmée par les travaux sur les cyanophages de Frederickson et al. (2003). La diversité virale semble changer de manière moins marquée selon une échelle spatiale horizontale. Notons cependant que certains auteurs ont trouvé des changements de la communauté virale entre la zone littorale et la zone pélagique d'un lac (Jiang et al., 2004) et d'un milieu marin (Chen et al., 1996; Wilson et al., 1999; Wang et Chen, 2004).

Par ailleurs, la diversité virale peut changer sur une échelle temporelle (Wommack et al., 1999; Marston et Sallee, 2003; Wang et Chen, 2004). Encore une fois, ces changements peuvent être attribués à des changements de température et, plus généralement, aux facteurs qui influencent la population de l'hôte. La diversité virale semble en tout cas être très dynamique au cours d'une prolifération de l'hôte (Schröder et al., 2003).

En conclusion, virus et hôtes interagissent certainement de façon dynamique ; la densité et la diversité de la population hôte semblent avoir une influence importante sur la diversité des virus, et *vice versa*.

### **2.2.7.2. Les mécanismes influant la composition de la communauté virale à l'échelle locale et régionale**

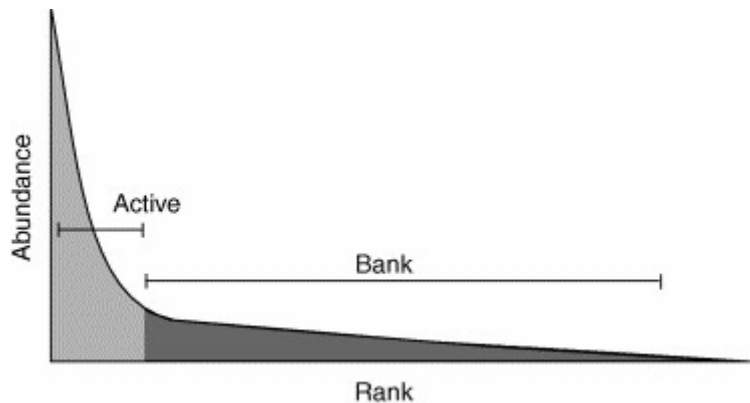
Comme nous l'avons déjà vu pour les bactéries, nous pouvons nous interroger également quant aux mécanismes qui influencent la composition de la communauté virale. Ainsi, les concepts d'ubiquité et de métacommunauté seront analysés. Enfin, nous présentons un concept très récent, le concept de "Bank".

#### 2.2.7.2.1. Biogéographie ou ubiquité ?

Si chaque écosystème est caractérisé par des populations virales endémiques, alors la diversité virale globale, estimée par des approches métagénomiques, s'élèverait à hauteur de 100 millions de génotypes viraux différents (Rohwer, 2003). Si au contraire, les flux de virus entre les différents environnements sont importants, alors la diversité locale sera grande, mais la diversité globale sera relativement faible. Au moins deux études (Breitbart et al., 2004a ; Short et Suttle, 2005) ont mis en évidence l'existence de séquences de phages très similaires, voir identiques dans des biomes très différents (*ex.* : marin, eau douce, terrestre) ce qui privilégie le passage de virus d'un biome à l'autre. Sano et al. (2004) ont directement vérifié l'hypothèse du passage des virus d'un biome à l'autre. Des virus isolés à partir d'un échantillon de sol, de sédiment et d'eau douce ont pu infecter des communautés marines et se propager ainsi très rapidement (48 heures). Afin d'expliquer cela, deux hypothèses sont proposées : 1) les mêmes hôtes sont présents dans des biomes très différents ; ou 2) les virus ne sont pas totalement hôte spécifique. La seconde hypothèse semble être la plus plausible, car la capacité des virus à infecter des hôtes non spécifiques (angl. : « cross-infection ») a été mise en évidence par différents auteurs (Jensen, 1998; Sullivan et al., 2003 ). D'autres travaux scientifiques reposant sur des méthodes différentes sur des communautés différentes appuient l'hypothèse qu'il n'y a pas de distribution biogéographique des populations virales, et que le principal facteur biotique limitant pour une population virale est l'abondance de l'hôte spécifique et sensible. Ainsi, en milieu marin, Zhong et al. (2002) n'ont pas trouvé de corrélation entre la distance géographique et la variabilité génétique des cyanophages. Les conclusions de cette étude confirment les résultats d'autres études conduites en milieu côtier et en milieu océanique avec des méthodes génétiques différentes et des communautés virales différentes : RFLP sur des virus causant la lyse de *Micromonas pusilla* (Cottrell et Suttle, 1995) ; RFLP sur des cyanophages (Wilson et al., 1993) ; RFLP sur des virus à microalgues (Chen et al., 1996) ; DGGE sur des virus à microalgues (Short et Suttle, 2002) ; approche d'hybridation sur des vibriophages marins, (Kellogg et al., 1995).

### 2.2.7.2.2. Le modèle de Bank

Très récemment, Breitbart et Rohwer (2005) ont proposé un nouveau modèle qui puisse expliquer d'une part pourquoi les virus sont distribués sur une échelle globale, et d'autre part pourquoi la diversité virale à un niveau local est grande. Dans ce modèle, seuls les virus les plus abondants sont réellement actifs ; les autres sont inactifs, rares et font partie d'un « pool » (« bank ») à partir duquel des « nouveaux » virus peuvent être recrutés. Suite à des changements environnementaux, la croissance de nouveaux hôtes sera favorisée et cela déclenchera le recrutement et la propagation de virus spécifiques présent dans le « pool ». Les résultats en provenance de deux analyses métagénomiques semblent être en accord avec ce modèle car ils montrent que la majorité des génotypes viraux sont extrêmement rares et que seulement peu de génotypes prédominent la communauté (Breitbart et al., 2002; Breitbart et al., 2003a). Ce modèle ressemble fortement au modèle « killing the winner » (Thingstad et Lignell, 1997) à la différence que dans le modèle de « Bank » la partie inactive ne disparaît pas totalement en réponse à des facteurs environnementaux changeants. Comment cette partie inactive puisse persister sans être dégradée, compte tenu de la demi-vie très courte d'une particule virale (quelques jours) n'est cependant pas résolu.



**Fig.11.** Modèle de Bank ; la distribution de génotypes viraux en abscisse et leur abondance relative en ordonné (rang-abondance) dans une communauté. Voir texte pour plus de détails. D'après Breitbart et Rohwer (2005).

### **3. Approches moléculaires pour déterminer la diversité des communautés microbiennes aquatiques**

La disponibilité d'approches biomoléculaires a changé notre conception de la diversité microbienne (Amann et al., 1995; Hugenholtz et al., 1998; Giovannoni et Rappé, 2000).

Dans l'article qui suit (**article I**) nous présentons les méthodes les plus couramment utilisées pour l'analyse de la diversité microbienne en milieu aquatique. En général, nous distinguons les méthodes d'analyse génétiques basées sur une amplification préalable d'une séquence d'ADN par PCR, des méthodes qui ne nécessitent pas l'emploi de la PCR. Nous discuterons des avantages, et des biais des techniques du clonage-séquençage, de la DGGE/TGGE, de la SSCP, de la T-RFLP, de l'ARISA/RISA, de la technique de FISH, et de la technique de réassociation d'ADN. Enfin, nous aborderons les perspectives attrayantes fournies par des techniques novatrices, telles que la PCR en temps réel et la technique de « microarray » ou puce à ADN.





## Review

# Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities

Ursula Dorigo<sup>a</sup>, Laurence Volatier<sup>b</sup>, Jean-François Humbert<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR CARTELE, Equipe de Microbiologie Aquatique, BP 511, 74203 Thonon Cedex, France

<sup>b</sup>ENTPE, Laboratoire des Sciences de l'Environnement, 69518 Vaulx-en-Velin, France

Received 25 May 2004; received in revised form 10 March 2005; accepted 16 March 2005

## Abstract

For the past 20 years, the increased development and routine application of molecular-based techniques has made it possible to carry out detailed evaluations of the biodiversity of aquatic microbial communities. It also offers great opportunities for finding out how this parameter responds to various environmental stresses. Most of these approaches involve an initial PCR amplification of a target, which is generally located within the ribosomal operon. The amplification is achieved by means of primers that are specific to the organisms of interest. The second step involves detecting sequence variations in the PCR fragments either by a cloning/sequencing analysis, which provides a complete characterization of the fragments, or by an electrophoretic analysis, which provides a visual separation of the mixture of fragments according to sequence polymorphism (denaturing or temperature gradient gel electrophoresis, single strand conformation polymorphism) or length polymorphism (terminal-restriction fragment length polymorphism, automated ribosomal intergenic spacer analysis). Other non-PCR-based methods are also commonly used, such as fluorescence in-situ hybridization and DNA re-association analysis. Depending on the technique used, the information gained can be quite different. Moreover, some of these analyses may be rather onerous in terms of time and money, and so not always suitable for screening large numbers of samples. The most widely used techniques are discussed in this paper to illustrate the principles, advantages and shortcomings of each of them. Finally, we will conclude by evaluating the techniques and discussing some emerging molecular techniques, such as real-time PCR and the microarray technique.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Biodiversity; Microbial communities; Molecular approaches

## Contents

|  |   |
|--|---|
| 1. Introduction . . . . .  | 2 |
| 2. PCR-based molecular tools for the assessment of aquatic microbial diversity . . . . .                     | 2 |
| 2.1. Random sequencing in clone libraries . . . . .  | 2 |
| 2.2. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)/temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). . . . . | 4 |
| 2.3. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) . . . . .  | 4 |

\*Corresponding author. Tel.: +33 4 50 26 78 09; fax: +33 4 50 26 78 06.

E-mail address: humbert@thonon.inra.fr (J.-F. Humbert).

|   |   |
|---|---|
| 2.4. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) . . . . .   | 5 |
| 2.5. Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) . . . . . | 5 |
| 3. Molecular tools for assessing aquatic microbial diversity that do not involve PCR . . . . .                        | 6 |
| 3.1. Fluorescence in-situ hybridization (FISH). . . . .   | 6 |
| 3.2. DNA re-association analysis . . . . .  | 6 |
| 4. Prospects and conclusions . . . . .  | 7 |
| Acknowledgements . . . . .  | 8 |
| References . . . . .  | 8 |

## 1. Introduction

As recently shown by [Morris et al. \(2002\)](#), the number of studies dealing with biodiversity of microbial communities has increased exponentially over the last 15 years. Microbial diversity studies were limited in the past by the lack of methodological tools, but the availability of the new molecular methods reviewed here has made it possible to investigate this topic. The increased interest in microbial diversity has largely been driven by the search for new bioactive compounds with some peripheral interest in biogeochemical cycles, and their influence on issues such as global climate change ([Chapin III et al., 2000](#)). The diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic microbial communities has now generally been estimated on the basis of phenotypic characters that make clear identification at the species level possible. In contrast, our knowledge of prokaryotic organisms is particularly limited. Their small size, the absence of distinguishing phenotypic characters, and the fact that most of these organisms cannot be cultured are the most important factors that limit the evaluation of their biodiversity ([Pace, 1997](#); [Torsvik and Øvreås, 2002](#); [Torsvik et al., 2002](#)). It would appear that only between 0.5% and 10% of prokaryote biodiversity has actually been identified ([Cases and de Lorenzo, 2002](#)). The advent of culture-independent methods, such as molecular biological techniques, has changed our view of microbial diversity ([Hugenholtz et al., 1998](#); [Vandamme et al., 1996](#); [Giovannoni and Rappé, 2000](#); [Olsen et al., 1986](#); [Amann et al., 1995](#); [Rossello-Mora and Amann, 2001](#)). This can be illustrated by the papers of [Béjà et al. \(2002\)](#) and [Moon-van der Staay et al. \(2001\)](#), which have revealed unsuspected diversity among microbial marine communities of prokaryotes and eukaryotes, respectively.

A significant number of studies dealing with microbial biodiversity involve the use of molecular tools. They have often focused on investigating the dynamics of the composition and structure of microbial populations and communities in defined environments, and the impact of specific factors, such as pollution by xenobiotics, on microbial diversity ([Morris et al., 2002](#)). In most of these papers, the main purpose of the research was to investigate the origin and conservation of microbial

biodiversity. In contrast, there have been very few publications about the relationships between biodiversity and ecosystem functioning at different spatial and temporal scales, even though this is currently a topic of a widespread debate within the scientific community (e.g. [Loreau, 1998](#); [Naeem et al., 2002](#); [Yachi and Loreau, 1999](#)).

In this mini-review, we will present the molecular approaches most commonly used to assess microbial diversity in aquatic ecosystems, and will highlight in particular their advantages and limitations. Among the numerous tools available, we will distinguish between those which are primarily based on using PCR to amplify a target sequence during the first phase, and those that are non-PCR-based ([Fig. 1](#)). Finally, we will conclude this paper by discussing the prospects offered by emerging new technologies, such as real-time PCR and microarray technologies.

## 2. PCR-based molecular tools for the assessment of aquatic microbial diversity

In the tools discussed below, the initial step relies on using PCR to amplify a target sequence. The choice of primers makes it possible to target the sequence at different taxonomic levels (strain, species, genus, etc.). The final PCR products obtained contain a mixture of multiple copies of the same fragment amplified at the chosen taxonomic level (strain, species, genus, etc.).

### 2.1. Random sequencing in clone libraries

The first stage of this approach involves cloning the PCR products and then, in a second phase, carrying out random sequencing within the clone library resulting from the first cloning step. Sequence analysis makes it possible to identify the dominant copies present in the initial PCR products. Comparing these sequences with those available in sequence databases (Genebank<sup>TM</sup> or EMBL), yields information about the identity or relatedness of the new sequences to known species. The most incisive way to infer phylogenetic relationship from molecular sequence data is to construct phylogenetic trees (for a review see [Olsen et al., 1986](#); [Woese,](#)

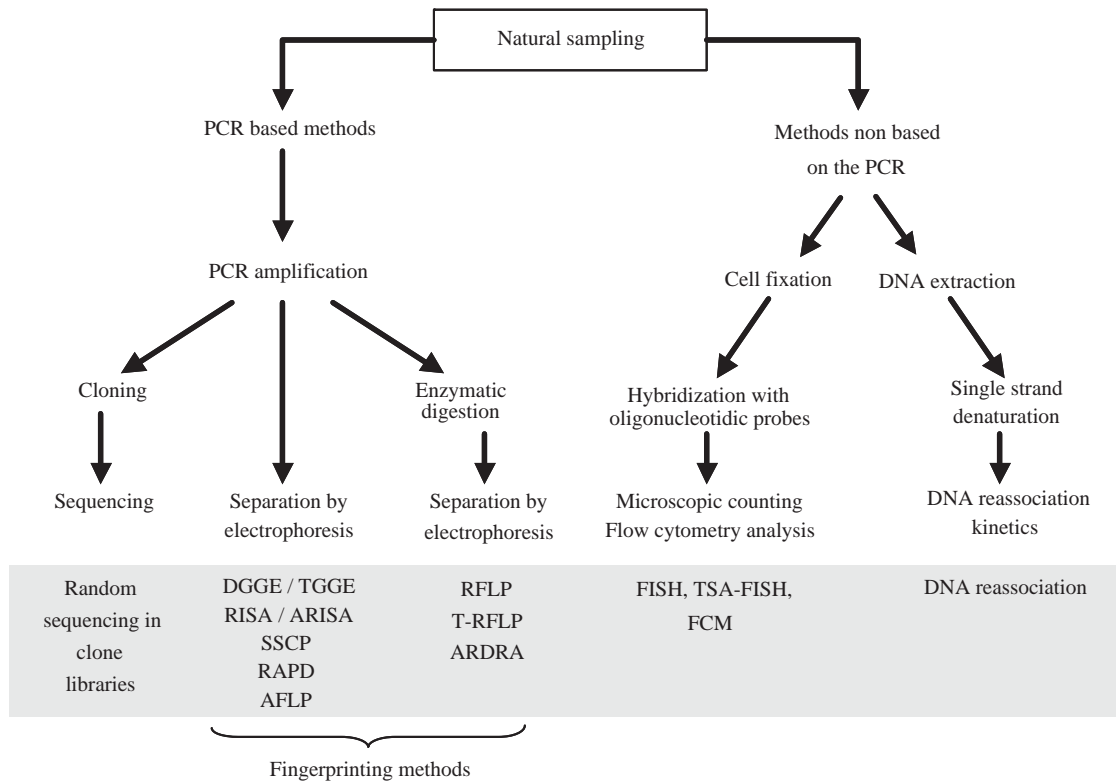


Fig. 1. Diagram of the different molecular approaches for assessing the genetic diversity of microbial communities. DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis, TGGE: Temperature gradient gel electrophoresis, RISA: Ribosomal intergenic spacer analysis, ARISA: Automated ribosomal intergenic spacer analysis, SSCP: Single strand conformation polymorphism, RAPD: Random amplified polymorphic DNA, AFLP: Amplified fragment length polymorphism, (t)-RFLP: (terminal)- Restriction fragment length polymorphism, ARDRA: Amplified ribosomal DNA restriction analysis, (TSA)-FISH: (tyramide signal amplification)-Fluorescence in situ hybridization, FCM: Flow cytometry.

1987). The sequence information can be used to compare species richness or diversity in different samples, but can also be used as the basis for developing specific oligonucleotides required for other molecular methods. In this way probes are designed for use in fluorescence in-situ hybridization (FISH), and primers for use in denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analyses. The cloning-sequencing approach was first used by Giovannoni et al. (1990) to target 16S rDNA, in order to estimate the diversity in the Sargasso Sea bacterioplankton, and later in numerous studies of the same topic (e.g. Fuhrman et al., 1993; Mullins et al., 1995). In freshwater, this approach has been used to study bacterial diversity in various lakes and revealed the predominance of some bacterial divisions, such as *Proteobacteria* (particularly in  $\beta$ -*Proteobacteria*), *Bacteroides* and *Actinobacteria* (Eiler and Bertilsson, 2004; Glöckner et al., 2000; Hiorns et al., 1997). In the same way, Zwart et al. (1998) analyzed 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe that had differing pH and trophic states. The findings indicated the existence of clades of globally distributed

freshwater bacteria. In another interesting study, Zwart et al. (2002) analyzed all the available 16S rDNA sequences from freshwater plankton in rivers and lakes, and showed that planktonic bacteria are distributed world-wide, and that these freshwater systems have specific bacterial communities, which are distinct from the bacteria in the neighboring soil and sediment environments. There have been fewer studies of eukaryotic diversity, but there are the papers of Díez et al. (2001) and Moon-van der Staay et al. (2001); the latter revealing unexpected diversity in oceanic eukaryotic picoplankton. The cloning-sequencing strategy has also been used to compare species composition in phyto-benthic communities at different sampling sites in a small French river containing both polluted and unpolluted areas (Dorigo et al., 2002).

Apart from the skews linked to the PCR and cloning steps, the problem with this method is how to obtain a correct description of the diversity in a community. Parametric or non-parametric methods are both proposed by different authors as providing better estimates of the species richness from samples, and as ways to



compare the diversity in different environments (for a review of these methods see Colwell and Coddington, 1994; Hughes et al. 2001; Bohannan and Hughes, 2003; Colwell et al., 2004; Singleton et al., 2001). Rarefaction curves or sample-based coverage estimators of species richness could be used to find out whether more sequences are required before diversity can be assessed correctly. In high diversified ecosystems, the PCR-cloning-sequencing approach can be very laborious, time-consuming and expensive. For the same reasons this technique is not well suited for studying seasonal or spatial successions of microbial communities.

### 2.2. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)/ temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and thermal gradient gel electrophoresis (TGGE) were introduced 10 years ago. They are now routinely used to assess the diversity of microbial communities, and to monitor their dynamics (Muyzer, 1999; Muyzer et al., 1996; Muyzer and Smalla, 1998). These two methods can be used to obtain qualitative and semi-quantitative estimations of biodiversity. They typically involve amplifying the genes encoding the 16S rRNA and then, separating these fragments in a polyacrylamide gel. Studies of metabolically-active populations targeting 16S rRNA have also been reported (Felske et al., 1998). DGGE/TGGE exploits the fact that DNA molecules that have the same length, but differ at least by one nucleotide, can be separated by electrophoresis through a linear gradient of increasing chemical denaturants of urea and formamide (DGGE), or through a linear temperature gradient (TGGE). The two strands of a DNA molecule separate or melt at a specific temperature, which depends on the hydrogen bonds formed between complementary base pairs (GC-rich domains melt at higher temperatures), and on the attraction between neighboring bases on the same strand. When run on a polyacrylamide gel, the mobility of the molecule is retarded when the first melting domain is reached, resulting in partial dissociation of the fragment. Complete strand separation is prevented by the presence of a high melting domain, known as a GC clamp, which is added to one primer. The DGGE/TGGE pattern obtained provides a rapid identification of the predominant species. A big advantage of these techniques is that they make it possible to obtain taxonomic information by excising, re-amplifying and sequencing specific DNA fragments or by hybridization analysis with taxon-specific oligonucleotides probes (Heuer et al., 1999; Riemann and Winding, 2001).

Most DGGE/TGGE studies focus on the number of different bands in order to get an estimate of the community richness, and there have been very few studies that also take into account the intensity of each

band as providing an estimate of the abundance of each band-population (Nübel et al., 1999).

DGGE/TGGE approaches have been used in a huge number of studies of eubacterial, archaeal and eukaryotic communities in freshwater and coastal waters in relation to herbicide exposure and/or spatio-temporal variations (Øvreås et al., 1997; van Hannen et al., 1998; El Fantroussi et al., 1999; Casamayor et al., 2000, 2001, 2002; Lindström, 2000; Riemann and Middelboe, 2002; Zwart et al., 2002; Lyautey et al., 2003; Schauer et al., 2003). Recently, several papers (Short and Suttle, 1999; Dorigo et al., 2004; Frederickson et al., 2003; Marston and Sallee, 2003) have also reported using this tool to assess biodiversity in natural aquatic communities of bacteriophages and cyanophages. Dorigo et al. (2004) obtained highly congruent results for the temporal variations of myocyanophage diversity in Lake Bourget (France) using both the cloning-sequencing and DGGE approaches.

The main limitations are the choice of the primer set and the optimization of the gel running conditions before the technique can be used to screen for sequence polymorphism of a particular gene (Muyzer et al., 1993; Hayes et al., 1999; Wu et al., 1998), and the difficulty of comparing patterns across gels, when these patterns include numerous bands. This implies that multiple gels and different combinations of samples are required if numerous samples are being investigated. Other limitations associated with this technique are the fact that DNA fragments with differing sequences may migrate together, and its limited sensitivity of detection of rare community members (Vallaeyts et al., 1997). There are several different ways to carry out the statistical analysis of data obtained by DGGE/TGGE, which are well described in the paper by Fromin et al. (2002).

### 2.3. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) detects sequence variations among DNA fragments, which are usually PCR-amplified, 16S rRNA gene sequences. SSCP was originally described by Orita et al. (1989), and was first used to assess the diversity of natural microbial communities by Lee et al. (1996). At low temperatures, single-stranded DNA will adopt a three-dimensional conformation determined by the intramolecular interactions that influence their electrophoretic mobility in a non-denaturing polyacrylamide gel. PCR fragments of the same size, but with differing nucleotide sequences will be separated due to their differing electrophoretic mobility. Differences in mobility are detected on autoradiograms (radioactive detection), by silver staining the bands or using fluorescently labeled primers that are subsequently detected by an automated DNA sequencer (non-radioactive detection).

There have been a few publications that report studies of microbial diversity in aquatic ecosystems using the SSCP method. For example, Ross et al. (2001) and Wenderoth et al. (2003) have monitored changes in groundwater microbial communities resulting from various strategies of bioremediation of polluted aquifers. However, there have also been several papers reporting the use of this tool to assess the diversity of rhizosphere microbial communities (Schwieger and Tebbe, 1998; Schmalenberger and Tebbe, 2003), to study microbial succession during composting (Peters et al., 2000), and to characterize bacterial community dynamics in the Salers cheese (Duthoit et al., 2003). A recent application of PCR–SSCP to functional genes has provided some very interesting information likely to be relevant to possible applications of this technique to investigate changes under various environmental conditions in gene families that play functional roles in the environment (Junca and Pieper, 2004).

The detection of sequence variation using PCR–SSCP is generally good, but the detection sensitivity tends to decrease as the fragment length increases (Hayashi and Yandell, 1993). Phylogenetic assignment of the bands is possible if the fragment separation is carried out in gel. In the study of Schmalenberger and Tebbe (2003), sequencing was used to demonstrate that, as previously highlighted for DGGE analyses, a single band may consist of several sequences, and that the electrophoretic conditions may therefore affect the resolution of genetic profiles and thus the estimated diversity. These authors suggest that gene probes and Southern hybridization could provide valuable control instruments.

#### 2.4. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis is a community fingerprinting technique that is based on the restriction digest of double-stranded fluorescently end-labeled PCR fragments (Liu et al., 1997; Marsh, 1999). One primer is labeled at the 5' terminus with a fluorescent dye. As a general rule, a single species will contribute a single terminal fragment of a given size, although several species may have terminal fragments of identical size. T-RFLP is a high-throughput, reproducible method that can be used to carry out both qualitative and quantitative analyses of a particular gene in a community. Fragments of the 16S rRNA gene are usually targeted. The fragments are separated by gel electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gels or by capillary electrophoresis, and distinguished by laser-induced fluorescence detection. These fluorescence data are converted into electrophoregrams, in which the peaks represent fragments differing in size, and the areas under the peaks indicate the relative proportions of the

fragments. The advantage of this technique is its ability to detect even rarer members of a microbial community. In addition, phylogenetic assignments can be inferred from the sizes of the terminal restriction fragment (T-RF) using web-based resources that predict T-RF sizes for known bacteria (Kent et al., 2003).

Like SSCP, T-RFLP analysis has been used to compare the dynamics both between and within microbial populations in soils and activated sludge (e.g. Bruce, 1997; Liu et al., 1997; Marsh et al., 1998; Moeseneder et al., 1999; Osborn et al., 2000), but there are also some recent publications concerning aquatic ecosystems (Braker et al., 2001; Inagaki et al., 2002; Nusslein et al., 2002; Takai et al., 2002; Konstantinidis et al., 2003; Matz and Jurgens, 2003; Vetriani et al., 2003).

The limitations and pitfalls that have been identified for this technique include the formation of pseudo-terminal restriction fragments, which can result in the overestimation of microbial diversity, which was reported by Egert and Friedrich (2003). The choice of the primers and restriction enzymes also seems to be very important for obtaining an accurate evaluation of the microbial diversity (Engebretson and Moyer, 2003; Lueders and Friedrich, 2003). In addition, Engebretson and Moyer (2003) have shown that T-RFLP seems to be very useful for estimating diversity in communities characterized by low-to-intermediate species richness, but is not suitable for complex microbial populations.

#### 2.5. Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) and automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA)

Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) was developed by Borneman and Triplett (1997) and was firstly applied to study the microbial diversity in soils. The method involves PCR amplification of the spacer region located between the small (16S) and large (23S) subunit rRNA genes in the rRNA operon. This region is extremely variable in size (ranging from 50 bp to more than 1.5 kb) and nucleotide sequence. Primers are thus defined to target to conserved regions in the 16S and 23S genes. In RISA, the polymorphism revealed is linked to the length heterogeneity. Amplification products differing in length are separated on polyacrylamide gels on the basis of their size and visualized by silver staining. This tool has been used successfully to assess community fingerprints, each band corresponding to at least one organism.

Fisher and Triplett (1999) developed the automated version of RISA, which they named ARISA, in order to be able to assess community diversity more rapidly and more efficiently. PCR amplification of the 16S–23S region is performed using a fluorescently labeled, forward primer, which makes it possible to detect the amplicons by automated capillary electrophoresis. The total number of distinct fluorescent peaks in the ARISA

data within a given sample is taken as an estimate of species diversity, and the sizes of the fragments can be compared to those in the GenBank database. In the study of Fisher et al. (2000), ARISA was successfully applied to a northern, temperate, oligotrophic lake to investigate the effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity (Fisher et al., 2000). Similarly, Graham et al. (2004) investigated the seasonal diversity pattern of bacterioplankton communities in a northern temperate humic lake, and tried to relate changes in ARISA fingerprints to changes in phytoplankton and protozoan diversity. In another study, Hewson and Fuhrman (2004) investigated richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in an Australian Bay. Finally, in a recent and interesting study, Yannarell and Triplett (2005) assessed the influence of geographic and environmental variables on the diversity of lake bacterial assemblages. These authors also investigated the impact of various treatments and transformations applied to the bacterial data set.

Finally, it appears that all these PCR-based tools can provide a considerable amount of information about the species composition and diversity of aquatic microbial communities. However, they all suffer from the same sources of bias, linked for example to the DNA extraction and the generation of artifactual heteroduplex fragments during PCR amplification (Wang and Wang, 1996; von Wintzingerode et al., 1997; Muyzer, 1999; Giraffa and Neviani, 2001), plus the various specific biases inherent in each technique. In a few publications, different methods have been evaluated and compared using the same study models (Moeseneder et al., 1999; Casamayor et al., 2002; Nikolcheva et al., 2003; Dorigo et al., 2004). The results are generally similar, although some methods seem to perform less well in some specific situations.

### 3. Molecular tools for assessing aquatic microbial diversity that do not involve PCR

#### 3.1. Fluorescence in-situ hybridization (FISH)

The fluorescence in-situ hybridization (FISH) technique using rRNA-targeted fluorescent probes is commonly used in microbiology to investigate the overall taxonomic composition of bacterial communities or assemblages. Probes can be designed to be complementary to species-, group-, or kingdom-specific target sites. Cells are fixed to make them permeable to the probe, which then hybridizes its specific target site. Generally, a probe targeting the *Bacteria* domain is used in combination with more specific probes. The most widely used probe for aquatic ecosystems is probably the eubacterial probe EUB338 (Bouvier and Del Giorgio, 2003). After

hybridization, the microbial communities are typically examined by epifluorescent microscopy (Amann et al., 1995; Glöckner et al., 1999; Pernthaler et al., 2002b). For more details about FISH we refer the reader to the excellent and exhaustive review of the FISH technique by Wagner et al. (2003).

Various papers report use of this method to explore bacterial communities in activated sludge, marine and freshwater environments, and in both pristine and contaminated aquifers (Wagner et al., 1993; Borneman et al., 1996; Snidr et al., 1997; Shi et al., 1999; Cottrell and Kirchman, 2000). Despite the numerous advantages of FISH, the application of the technique to investigate natural samples still produces some false positive and false negative results. Both methodological and environmental factors can influence FISH performance. The choice of the probe and of the fluorochrome, the stringency conditions, the hybridization temperature, the fact that some microorganisms are autofluorescent, the ecosystem type, and the physiological state of the target cells can all significantly influence the efficiency of this tool (Ouverney and Fuhrman, 1997; Daims et al., 1999; Moter and Göbel, 2000; Fuchs et al., 2001; Bouvier and Del Giorgio, 2003).

Less commonly, FISH has been combined with flow cytometry (Amann et al., 1990; DeLong, 1993; Wallner et al., 1993; Lebaron and Joux, 1994; Simon et al., 1995). The main advantages of this combination are the multiparametric analysis of samples and its relatively fast and sensitive determination of even rare populations. However, very few publications report using this approach for ecological studies, although there are numerous papers in the domain of medical research (e.g. Baerlocher and Lansdorp, 2003).

Recently, an improvement of the FISH technique has been proposed. The modified technique, known as TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification of FISH), boosts the fluorescent signal from hybridized cells 20–40 times fold versus background. It has been successfully applied, for example, to picoeukaryotes in Morlaix Bay, but this technique is time consuming, which limits the number of samples that can be studied (Biegala et al., 2003). Another improvement of the FISH method has been made by Pernthaler et al. (2002a) who have introduced CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-FISH) in studies of natural microbial assemblages. Briefly, samples are concentrated on membrane filters, which are then embedded in low-gelling-point agarose, before permeabilizing the cells using lysozyme. In Pernthaler et al.'s study, up to 94% of bacterial plankton cells were labeled by CARD-FISH.

#### 3.2. DNA re-association analysis

This technique is used for whole DNA comparisons between two communities, or for studying the sequence

variety of a single community. In both cases, the total DNA is extracted and purified. When comparing two communities, the DNA of one community may be radioactively labeled and used as a template. Cross-hybridization between the two DNA samples is then carried out, and the degree of similarity is monitored. To investigate the sequence complexity, the re-association kinetics of the denatured single-strand DNA with the homologous sequence is monitored, and this ultimately reflects the size of the genome or the complexity of the DNA. The higher the degree of similarity between two communities or the greater sequence homology of a single community, the faster the re-association process and vice versa. The major limitation of this technique is the need to isolate the DNA of the community of interest from the complex matrix of DNA in the whole sample, and to produce very highly purified DNA. These shortcomings have so far prevented routine use of this technique. For further details see the review of Øvreås (2000), the review of Rossello-Mora and Amann (2001) and finally the mini-review of culture-independent molecular techniques of Ranjard et al. (2000). This technique has been used by Torsvik et al. (1990) and Øvreås et al. (1998) to evaluate biodiversity in aquatic communities. A recent paper from this team (Øvreås et al., 2003) reports congruent results using T-RFLP and reassociation techniques for estimating species richness in hypersaline environments.

#### 4. Prospects and conclusions

The fingerprinting approaches (DGGE, T-RFLP, SSCP, etc.), which are based on PCR amplification without any need to establish a clone library, are currently the most widely used tools in research involving the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. Although numerous technical biases have been identified, we still think, as suggested in the review of Morris et al. (2002), that these biases are all less important than those linked to sampling strategies or data analyses. Several interesting papers have been published about interpreting the fingerprinting data (Doolhopf et al., 2001; Fromin et al., 2002; Blackwood et al., 2003), and these have described various different approaches. Much of this information is also given in the paper of Morris et al. (2002).

Despite all these limitations, numerous publications show that over the past ten years a considerable amount of information has been obtained about the dynamics of the diversity of aquatic microbial communities using these PCR-based molecular approaches. All these tools provide only a relative determination of the various species present in the communities, and little information about cell metabolism or ecosystem function. This means that new approaches seem to be called for. Two

new methods look as though they could provide very interesting prospects for research in the next few years. The first of these is real-time quantitative PCR, and the second is microarray analysis.

Real-time quantitative PCR (Heid et al., 1996; Schmittgen, 2001) is a technique that now makes the quantitative determination of DNA and RNA much more accurate and reproducible than any other PCR-based tool. This system is based on detecting and quantifying a fluorescent reporter (a fluorescent probe or DNA-binding agent). By recording the amount of fluorescence at each cycle, it is possible to monitor the PCR reaction during the exponential phase, when the first significant increase in the amount of PCR product is correlated to the initial amount of target template. The more template is present at the beginning of the PCR reaction, the fewer cycles it takes to reach the point at which the fluorescent signal is first detected as being significantly greater than the background. This technique has many applications, such as determining viral and bacterial hosts and comparing gene expression. These applications have so far been used mainly for medical research purposes, but a few papers have shown that they could also be of interest for studies of natural ecosystems. For example, two studies demonstrated recently that this approach can be used to quantify the microcystin genotypes in populations of toxic *Cyanobacteria* (Kurmayer and Kutzenberger, 2003; Vaitomaa et al., 2003). This technique can also be used to determine microbial gene expression in the environment, as shown for example by Wawrik et al. (2002).

The principle of microarray technologies consists of using ordered sets of DNA molecules of known sequence, that are fixed to solid surfaces in a predetermined spatial order that allows them to be made available as probes in a manner very similar to the Northern and Southern blot methods (Southern et al., 1999). Microarray analysis is able to detect thousands of genes in a small sample simultaneously, and to analyze the expression of those genes. This technology is now becoming a central procedure in functional genomics (Schena et al., 1998; Wurmbach et al., 2003). However, in the past few years, an increasing number of papers have dealt with using of this microarray technology for studies of ecosystems. For example, cyanobacterial diversity can now be assessed in the field using a universal DNA microarray (Castiglioni et al., 2002). In the same way, Small et al. (2001) showed that microarray technology can be used to carry out a direct detection of microorganisms in environmental samples. Very interestingly, it appears that gene expression in mixed microbial communities can also be monitored using DNA microarrays (Dennis et al., 2003). Another example of DNA microarrays is given by Taroncher-Oldenburg et al. (2003) who apply this method to study functional gene diversity in the nitrogen cycle in the

environment. For more details about the applications of DNA microarrays, see the review of Ye et al. (2001).

The conclusion to be drawn from this mini-review of molecular approaches to the study of biodiversity in aquatic microbial communities is that we are just at the beginning of a very exciting period, during which increasingly integrated methods will make it possible to evaluate both the taxonomic and the functional diversity of complex microbial communities. As we pointed out in our Introduction, this information is of particular interest because it will enable us to elucidate the relationships between biodiversity and ecosystem functioning.

### Acknowledgements

We are grateful for the helpful criticism on an earlier version of the manuscript by anonymous reviewers. The English text was edited by M. Ghosh.

### References

- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Baerlocher, G.M., Lansdorp, P.M., 2003. Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry* 55, 1–6.
- Béjà, O., Suzuki, M.T., Heidelberg, J.F., Nelson, W.C., Preston, C.M., Hamada, T., Eisen, J.A., Fraser, C.M., DeLong, E.F., 2002. Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415, 630–633.
- Biegala, I., Not, F., Vaulot, D., Simon, N., 2003. Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5519–5529.
- Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.-H., Paul, E.A., 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 926–932.
- Bohannan, B.J.M., Hughes, J., 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 282–287.
- Borneman, J., Triplett, E.W., 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2647–2653.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., Triplett, E.W., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1935–1943.
- Bouvier, T., Del Giorgio, P.A., 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 3–15.
- Braker, G., Ayala-del-Rio, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A., Tiedje, J.M., 2001. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1893–1901.
- Bruce, K.D., 1997. Analysis of mer genes subclasses within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent-PCR-restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4914–4919.
- Casamayor, E.O., Schaefer, H., Bañeras, L., Pedrós-Aliós, C., Muyzer, G., 2000. Identification of spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 499–508.
- Casamayor, E.O., Muyzer, G., Pedrós-Aliós, C., 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.* 25, 237–246.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Diez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Aliós, C., 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond saltern. *Environ. Microbiol.* 4, 338–348.
- Cases, I., de Lorenzo, V., 2002. The grammar of (micro)-biological diversity. *Environ. Microbiol.* 4, 623–627.
- Castiglioni, B., Rizzi, E., Frosini, A., Mugnai, M.A., Ventura, S., Sivonen, K., Rajaniemi, P., Rantala, A., Wilmotte, A., Boutte, C., Consolandi, C., Bordoni, R., Mezzelani, A., Busti, E., Rossi-Bernardi, L., Battaglia, C., de Bellis, G., 2002. Application of an universal DNA microarray to cyanobacterial diversity assessment. *Minerva Biotechnol.* 14, 253–257.
- Chapin III, F.S., Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., Hooper, D.U., Lavelle, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E., Mack, M.C., Diaz, S., 2000. Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405, 234–242.
- Colwell, R.K., Coddington, J.A., 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 345, 101–118.
- Colwell, R.K., Xuano Mao, C., Chang, J., 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* 85, 2717–2727.
- Cottrell, M.T., Kirchman, D., 2000. Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the Cytophaga–Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1692–1697.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient

- for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444.
- DeLong, E.F., 1993. Single-cell identification using fluorescently labeled, ribosomal RNA-specific probes. In: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. (Eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, 1993. Lewis, Boca Raton, pp. 285–294.
- Dennis, P., Edwards, E.A., Liss, S.N., Fulthorpe, R., 2003. Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 769–778.
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., Massana, R., 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2932–2941.
- Dollhopf, S.L., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., 2001. Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: application of self-organizing maps and principal components analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.* 42, 495–505.
- Dorigo, U., Bérard, A., Humbert, J.F., 2002. Comparison of eukaryotic phytobenthic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microb. Ecol.* 4, 372–380.
- Dorigo, U., Jacquet, S., Humbert, J.F., 2004. Cyanophage diversity inferred from g20 gene analyses in the largest natural French Lake, Lake Bourget. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1017–1022.
- Duthoit, F., Godon, J.J., Montel, M.C., 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3840–3848.
- Egert, M., Friedrich, M.W., 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2555–2562.
- Eiler, A., Bertilsson, S., 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* 6, 1228–1243.
- El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 982–988.
- Engebretson, J.J., Moyer, C.L., 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4823–4829.
- Felske, A., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4581–4587.
- Fisher, M., Triplett, E.W., 1999. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636.
- Fisher, M.M., Klug, J.L., Lauster, G., Newton, M., Triplett, E.W., 2000. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microb. Ecol.* 40, 125–138.
- Frederickson, C.M., Short, S.M., Suttle, C.A., 2003. The physical environment affects cyanophage communities in British Columbia inlets. *Microb. Ecol.* 46, 348–357.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvette, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4, 634–643.
- Fuchs, B., Syutsubo, K., Ludwig, W., Amann, R., 2001. In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 961–968.
- Fuhrman, J.A., McCallum, T.B., Davis, A.A., 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1294–1302.
- Giovannoni, S.J., Rappé, M.S., 2000. Evolution diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman, D.L. (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley, New York, pp. 47–84.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, 60–63.
- Giraffa, G., Neviani, E., 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 19–34.
- Glöckner, F.O., Fuchs, B.M., Amann, R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3721–3726.
- Glöckner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., et al., 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5053–5065.
- Graham, J.M., Kent, A.D., Lauster, G.H., Yannarell, A.C., Graham, L.E., Triplett, E.W., 2004. Seasonal dynamics of phytoplankton and planktonic protozoan communities in a Northern temperate humic lake: diversity in a dinoflagellate dominated system. *Microb. Ecol.* 48, 528–540.
- Hayashi, K., Yandell, D.W., 1993. How sensitive is PCR-SSCP. *Hum. Mutat.* 2, 338–346.
- Hayes, V.W., Y. Wu, Y., Osinga, J., Mulder, I.M., van der Vlies, P., Elfferich, P., Buys, C.H., Hofstra, R.M., 1999. Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis for denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 27, e29.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994.
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., Smalla, K., 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1045–1049.
- Hewson, I., Fuhrman, J.A., 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in

- Moreton Bay, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3425–3433.
- Hiorns, W.D., Methé, B.A., Nierzwicki-Bauer, S.A., Zehr, J.P., 1997. Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2957–2960.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180, 4765–4774.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., Bohannan, B.J.M., 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4399.
- Inagaki, F., Sakihama, Y., Inoue, A., Kato, C., Horikoshi, K., 2002. Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments. *Environ. Microbiol.* 4, 277–286.
- Junca, H., Pieper, D.H., 2004. Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environ. Microbiol.* 6, 95–110.
- Kent, A.D., Smith, D.J., Benson, B.J., Triplett, E.W., 2003. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6768–6776.
- Konstantinidis, K.T., Isaacs, N., Fett, J., Simpson, S., Long, D.T., Marsh, T.L., 2003. Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment. *Microb. Ecol.* 45, 191–202.
- Kurmayer, R., Kutzenberger, T., 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6723–6730.
- Lebaron, P., Joux, F., 1994. Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4345–4350.
- Lee, D.H., Zo, Y.G., Kim, S.J., 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3112–3120.
- Lindström, E.S., 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.* 40, 104–113.
- Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516–4522.
- Loreau, M., 1998. Biodiversity and ecosystem functioning: a mechanistic model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5632–5636.
- Lueders, T., Friedrich, M.W., 2003. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 320–326.
- Lyautey, E., Teissier, S., Charcossey, J.-Y., Rols, J.-L., Garabétian, F., 2003. Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section, assessed by DGGE analysis of a 16S rDNA fragment. *Aquat. Microb. Ecol.* 33, 217–224.
- Marsh, T.L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 323–327.
- Marsh, T.L., Liu, W.-T., Forney, L.J., Chen, H., 1998. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Water Sci. Technol.* 37, 455–460.
- Marston, M.F., Sallee, J.L., 2003. Genetic diversity and temporal variation in the cyanophage community infesting marine *Synechococcus* species in Rhode Island's coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4639–4647.
- Matz, C., Jurgens, K., 2003. Interaction of nutrient limitation and protozoan grazing determines the phenotypic structure of a bacterial community. *Microb. Ecol.* 45, 384–398.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J., 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518–3525.
- Moon-van der Staay, S.Y., De Wachter, R., Vaulot, D., 2001. Oceanic 18S rRNA sequences from picoplankton reveal new eukaryotic lineages. *Nature* 409, 607–610.
- Morris, C.E., Bardin, M., Berge, O., Frey-Klett, P., Fromin, N., Girardin, H., Guinebretière, M.-H., Lebaron, P., Thiéry, J.-M., Troussellier, M., 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 66, 592–616.
- Moter, A., Göbel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Met.* 41, 85–112.
- Mullins, T.D., Britschgi, T.B., Krest, R.L., Giovannoni, S.J., 1995. Genetic comparison reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 40, 148–158.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317–322.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1988. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., Wawer, C., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4.
- Naeem, S., Loreau, M., Inchausti, P., 2002. Biodiversity and ecosystem functioning: the emergence of a synthetic ecological framework. In: Loreau, M., Naeem, S., Inchausti,

- P. (Eds.), *Biodiversity and Ecosystem Functioning—Synthesis and Perspectives*. Oxford University Press, Oxford, pp. 3–11.
- Nikolcheva, L.G., Cockshutt, A.M., Bärlocher, F., 2003. Determining diversity of freshwater fungi on decaying leaves: comparison of traditional and molecular approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2548–2554.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Kühl, M., Muyzer, G., 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes 16S rRNA genes and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 422–430.
- Nusslein, B., Chin, K.J., Eckert, W., Conrad, R., 2002. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ. Microbiol.* 3, 460–470.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 337–365.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, Y., Hayashi, K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874–879.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2, 39–50.
- Ouverney, C.C., Fuhrman, J.A., 1997. Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloroamphenicol. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2735–2740.
- Øvreås, L., 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* 3, 236–251.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V., 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saellen vannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3367–3373.
- Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F.L., Torsvik, V., 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2739–2742.
- Øvreås, L., Daae, F.L., Torsvik, V., Rodriguez-Valera, F., 2003. Characterization of microbial diversity in hypersaline environments by melting profiles and reassociation kinetics in combination with terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microb. Ecol.* 46, 291–301.
- Pace, N.R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734–740.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R.I., 2002a. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–3101.
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F., Amann, R., 2002b. Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 661–667.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., Tebbe, C.C., 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 930–936.
- Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S., 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151, 167–177.
- Riemann, L., Winding, A., 2001. Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microb. Ecol.* 42, 274–285.
- Riemann, L., Middelboe, M., 2002. Stability of bacterial and viral community composition in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 219–232.
- Ross, N., Villemur, R., Marcandella, E., Deschenes, L., 2001. Assessment of changes in biodiversity when a community of ultramicrobacteria isolated from groundwater is stimulated to form a biofilm. *Microb. Ecol.* 42, 56–68.
- Rossello-Mora, R., Amann, R.I., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 39–67.
- Schauer, M., Balagué, V., Pedros-Alio, C., Massana, R., 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 163–174.
- Schena, M., Heller, R.A., Theriault, T.P., Konrad, K., Lachenmeier, E., Davis, R.W., 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* 16, 301–306.
- Schmalenberger, A., Tebbe, C.C., 2003. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol. Ecol.* 12, 251–262.
- Schmittgen, T.D., 2001. Real-time quantitative PCR. *Methods* 25, 383–385.
- Schwieger, F., Tebbe, C.C., 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4870–4876.
- Shi, Y., Zwolinski, M.D., Schreiber, M.E., Bahr, J.M., Sewell, G.W., Hickey, W.J., 1999. Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2143–2150.
- Short, S.M., Suttle, C.A., 1999. Use of the polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis to study diversity in natural virus communities. *Hydrobiologia* 401, 19–32.
- Simon, N., LeBot, N., Marie, D., Partensky, F., Vault, D., 1995. Fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2506–2513.
- Singleton, D.R., Furlong, M.R., Rathbun, S.L., Whitman, W.B., 2001. Quantitative comparison of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4374–4376.
- Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M., Chandler, D.P., 2001. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by



- using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4708–4716.
- Snaird, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884–2896.
- Southern, E., Mir, K., Shchepinov, M., 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nat. Genet.* 21, 5–9.
- Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C., Fredrickson, J.K., 2002. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5750–5760.
- Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E.M., Francis, C.A., Ward, B.B., 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1159–1171.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240–245.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782–787.
- Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F., 2002. Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics and controlling factors. *Science* 296, 1064–1066.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Møkelke, L., Sivonen, K., 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7289–7297.
- Vallaëys, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A., Soulas, G., 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microb. Ecol.* 24, 279–285.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Kerksters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438.
- van Hannen, E.J., van Agterveld, M.P., Gons, H.J., Laanbroek, H.J., 1998. Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Phycol.* 34, 206–213.
- Vetriani, C., Tran, H.V., Kerkhof, L.J., 2003. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6481–6488.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213–229.
- Wagner, M., Amann, R.I., Lemmer, H., Schleifer, K.-H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520–1525.
- Wagner, M., Horn, M., Daims, H., 2003. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr. Opin. Microb.* 6, 302–309.
- Wallner, G., Amann, R.I., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- Wang, G.C., Wang, Y., 1996. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology* 142, 1107–1114.
- Wawrik, B., Paul, J.H., Tabita, F.R., 2002. Real-time PCR quantification of *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) mRNA in diatoms and pelagophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3771–3779.
- Wenderoth, D.F., Rosenbrock, P., Abraham, W.R., Pieper, D.H., Hofle, M.G., 2003. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microb. Ecol.* 46, 161–176.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.
- Wu, F., Hayes, V.M., Osinga, J., Mulder, I.M., Looman, M.W., Buys, C.H., Hofstra, R.M., 1998. Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 26, 5432–5440.
- Wurmbach, E., Yuen, T., Sealfon, S.C., 2003. Focused microarray analysis. *Methods* 31, 306–316.
- Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1463–1468.
- Yannarell, A.C., Triplett, E.W., 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 227–239.
- Ye, R.W., Wang, T., Bedzyk, L., Croker, K.M., 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J. Microbiol. Methods* 47, 257–272.
- Zwart, G., Hiorns, W.D., Methé, B.A., van Agterveld, M.P., Huismans, R., Nold, S.C., Zehr, J.P., Laanbroek, H.J., 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 546–556.
- Zwart, G., Crump, B.C., Kamst-van Agterveld, M.P., Ferry, H., Suk-Kyun, H., 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 141–155.

## -CHAPITRE II- CONCEPTION DES TRAVAUX ET SITES D'ETUDES

Cette partie débute par une brève description des trois actions de recherche réalisées afin de répondre aux objectifs de ma thèse. Ensuite nous donnons quelques informations sur le traitement des échantillons récoltés, et enfin nous présentons les sites d'études. Nous invitons les lecteurs à consulter les Annexes afin d'avoir plus de détails sur les principes des méthodes d'analyses et des protocoles utilisés.

### 1. Comment répondre aux objectifs de la thèse

Afin de pouvoir caractériser la diversité bactérienne et virale au sein des écosystèmes lacustres grâce à des outils de biologie moléculaire et de pouvoir dégager de ce travail les facteurs et processus permettant de comprendre les patrons de diversité observés, nous avons réalisées **trois actions de recherche** :

- 1) La première visait à évaluer la représentativité d'un échantillon en milieu lacustre. Nous avons choisi le lac du Bourget comme site d'étude. La diversité bactérienne a été analysée au moyen de la DGGE sur de l'eau collectée à différentes profondeurs et à différents points dans le lac du Bourget, en hiver au moment du brassage du lac et en été au moment de la stratification de la colonne d'eau. L'**article II** décrit les résultats obtenus.
- 2) La seconde, concernait l'étude comparée de la diversité bactérienne dans trois grands lacs pré-Alpins (Bourget, Annecy et Léman). Cette diversité a été analysée au moyen de la DGGE et par la technique de clonage-séquençage sur de l'eau collectée dans chacun des trois lacs en surface et en profondeur et à trois saisons différentes (hiver, printemps et été). Il en résulte l'**article III**.
- 3) Enfin la troisième et dernière partie se proposait de révéler l'abondance et la diversité des cyanophages en milieu lacustre, notamment dans le lac du Bourget qui connaît de fortes proliférations de cyanobactéries. La diversité de ces virus a été étudiée par DGGE et par la technique de clonage-séquençage. L'**article IV** décrit ces résultats.

Afin que le lecteur puisse avoir une vision synthétique de nos travaux, nous indiquons dans le tableau ci-après (Tab.3) les points de prélèvements des échantillons d'eau collectés et analysés.

**Tab.3.** Récapitulatif des points et de la période de prélèvements d'eau et techniques utilisées afin d'analyser la diversité bactérienne ou virale dans l'ensemble de mes recherches.

| Article | Site d'étude   | Période échantillonnée       | Analyse de diversité                     |
|---------|--|------------------------------|--|
| II      | Lac du Bourget (point réf. et 18 autres points)                                    | Hiver et été 2003            | Eubactérienne (DGGE)                     |
| III     | Lac d'Annecy (point réf.)<br>Lac du Bourget (point réf.)<br>Lac Léman (point réf.) | Hiver, printemps et été 2003 | Eubactérienne (DGGE, clonage-séquençage) |
| IV      | Lac du Bourget (point réf.)  | septembre 2002-janvier 2003  | Cyanophages (DGGE et clonage-séquençage) |

Réf. : référence

-Afin d'analyser la **diversité bactérienne** nous avons :

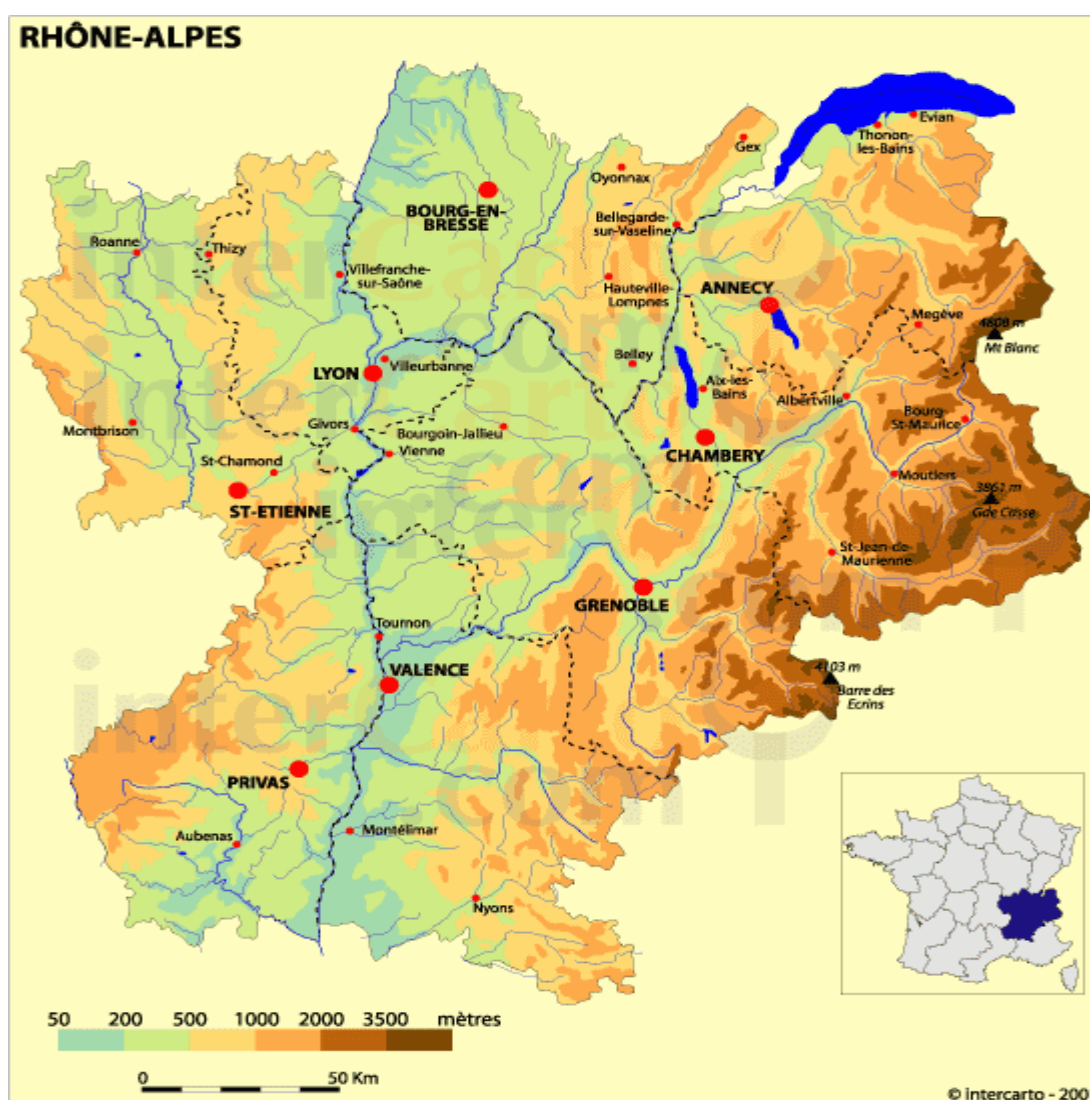
- \*récolté de l'eau lacustre
- \*préfiltré l'eau à travers de 2 µm
- \*récolté les cellules bactériennes sur un filtre de 0,2 µm
- \*extrait l'ADN génomique du filtre de 0,2 µm
- \*effectué une PCR en utilisant des amorces ciblant une séquence du gène codant pour le 16S ribosomal
- \*analysé les produits d'amplifications en DGGE et en clonage-séquençage

-Afin d'analyser la **diversité virale** nous avons :

- \*récolté de l'eau lacustre
- \*préfiltré l'eau à travers un filtre de type GF/F
- \*concentré par ultrafiltration tangentielle
- \*effectué une PCR directement sur l'eau concentrée et en utilisant des amorces « spécifiques » des cyanophages
- \*analysé les produits d'amplifications en DGGE et en clonage-séquençage

## 2. Présentation des sites d'études

Trois lacs pré-Alpins ont servi de sites d'études, les lacs d'Annecy, du Bourget et le Léman. Ces lacs ont une surface importante, ils sont profonds avec une dominance de l'habitat pélagique (zone de pleine eau, éloignée des rives et du fond) sur les habitats littoraux et benthiques. Ces lacs sont caractérisés par des eaux claires, avec peu d'apports de matière organique particulaire et humique en provenance du bassin versant (Perga, 2004). Ils peuvent être qualifiés de « lacs profonds » et sont caractérisés de plus par une thermocline séparant les eaux de surface chaude de celles en contact avec les sédiments. La figure ci-après (Fig.12.) indique la situation géographique des trois lacs au sein de la région Rhône-Alpes.



**Fig.12.** Localisation des lacs d'Annecy, du Bourget et Léman dans la Région Rhône-Alpes. Source Intercarto 2001.

Ces trois lacs se ressemblent fortement en ce qui concerne leur origine glaciaire, leur localisation, ainsi que leurs caractéristiques géologiques et physiques. Les différences majeures concernent en fait leur état trophique ; le lac d'Annecy est oligotrophe, alors que le lac du Bourget et le lac Léman sont mésotrophes. Une comparaison plus exhaustive est présentée dans le tableau n°4.

**Tab.4.** Sélection de quelques caractéristiques physico-chimiques et biologiques des lacs étudiés. La gamme de chaque paramètre se réfère à la valeur minimale et maximale enregistrée à une fréquence bimensuelle au cours de l'année 2003 entre 0 et 50 m de profondeur au site de référence.

|   | Lac d'Annecy          | Lac du Bourget            | Lac Léman             |
|---|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| Volume (km <sup>3</sup> )                                     | 1,1                   | 3,5                       | 89                    |
| Aire (km <sup>2</sup> )                                       | 28                    | 45                        | 585                   |
| Profondeur max/moy (m)  | 65/41,5               | 145/81                    | 310/172               |
| Altitude (m)  | 447                   | 232                       | 372                   |
| Temps de renouvellement d'eau (années)                        | 3,8                   | 10                        | 11                    |
| Etat trophique  | oligotrophe           | mésotrophe                | mésotrophe            |
| Prolifération de <i>P. rubescens</i>                          | aucune                | régulièrement depuis 1998 | rarement              |
| Type de mixage  | monomictique          | Mono-méromictique         | méromictique          |
| Phosphore total (µgP.L <sup>-1</sup> )                        | 2-10                  | 5-50                      | 8-37                  |
| Azote total (µgN.L <sup>-1</sup> )                            | 110-720               | 100-1.160                 | 130-920               |
| pH  | 7,61-8,49             | 7,57-8,72                 | 7,53-8,73             |
| Chlorophylle <i>a</i> (µg.L <sup>-1</sup> )                   | 0,09-1,78             | 0,1-19,27                 | 0,03-18,21            |
| Abondances bactériennes <sup>1</sup> (cell.mL <sup>-1</sup> ) | 7,56E+05<br>-4,86E+06 | 3,9e+05<br>-7,29E+06      | 6,81E+05<br>-1,27E+07 |
| Température (°C)  | 5,03-25,03            | 5,80-26,19                | 5,80-26,69            |
| Oxygène dissous (mg.L <sup>-1</sup> )                         | 6,66-14,98            | 5,20-14,74                | 5,66-16,52            |
| COT (mg.L <sup>-1</sup> )                                     | 1,27-2,68             | 1,52-2,65                 | 0,74-2,17             |
| Transparence de l'eau (m)                                     | 3,7-10                | 2,5-9,6                   | 2,5-14                |

<sup>1</sup>: les comptages ont été effectués par cytométrie en flux ; COT : carbone organique total

## 2.1. Le lac d'Annecy

### 2.1.1. Caractéristiques

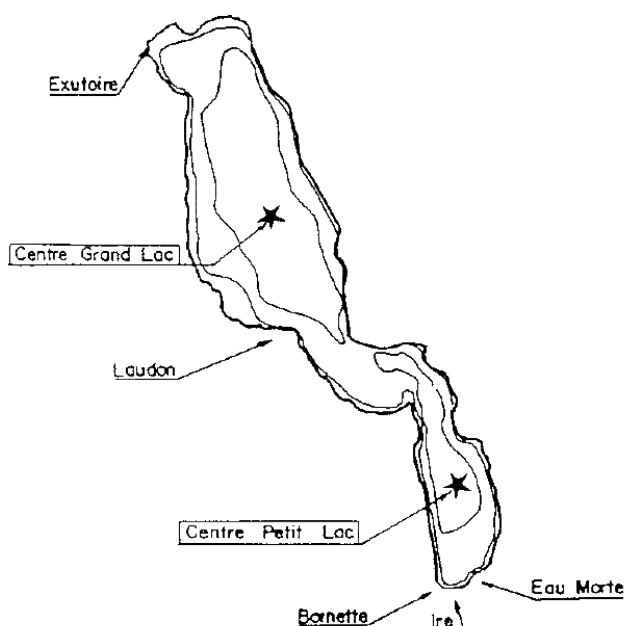
Le lac d'Annecy (45°54'N, 06°07'E) est situé en Haute-Savoie. En forme d'auge, il est, de part sa superficie, le second plus grand lac naturel entièrement français après le lac du Bourget. Ce lac est caractérisé par la présence de deux bassins, le grand lac au Nord et le petit lac au Sud. Une des caractéristiques originales de ce bassin, et qui rend ce lac très pur, est la présence de montagnes qui l'entourent au sud, à l'ouest et à l'est et qui en font un lac en grande partie fermé. Le débit moyen de son exutoire naturel, le Thiou, est de  $9.36 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 2.1.2. Historique

Le lac d'Annecy a connu un problème de pollution par le rejet des égouts durant les années 1940, jusqu'à ce que des travaux d'assainissement débutent en 1962. Le lac d'Annecy est maintenant classé comme oligotrophe, et sa réputation est d'être le lac le plus propre de France.

### 2.1.3. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué au centre du "grand lac", où la profondeur est maximale. Ce site de prélèvement est notre point de référence (Fig.13.).



**Fig.13.** Le lac d'Annecy, montrant les deux bassins, le grand et le petit lac. Les étoiles symbolisent les sites de références de chaque bassin. Nos échantillons proviennent tous du site de référence du grand lac.

## 2.2. Lac du Bourget

### 2.2.1. Caractéristiques

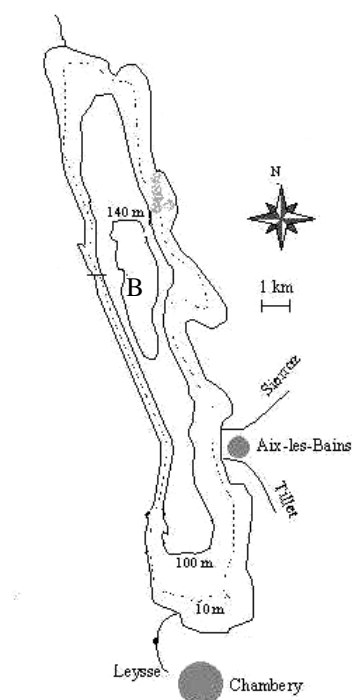
Le lac du Bourget (45°48'N, 05°49'E) est situé en Savoie, près de Chambéry. Sa forme est rectangulaire et allongée. C'est le plus grand lac naturel entièrement français. Il est alimenté par la Leysse, le Sierroz et le Tillet, et se déverse dans le Rhône, au nord, par le canal de Savières.

### 2.2.2. Historique

Le lac du Bourget a connu, à partir des années 1960, une forte dégradation de son état trophique liée à des apports excessifs en nutriments (phosphore et azote). Suite aux mesures prises pour contrôler ces apports, la qualité chimique des eaux s'est améliorée, mais le fonctionnement écologique reste encore très perturbé. Les proliférations de micro-algues et de cyanobactéries qui surviennent régulièrement dans cet écosystème reflètent ce dysfonctionnement (Anneville, 2001 ; Jacquet et al., 2005a). En effet, depuis 1998, des suivis montrent une prolifération importante de *Planktothrix rubescens*, une cyanobactérie filamenteuse et toxique (Friaud et al. 2005, sous presse).

### 2.2.3. Echantillonnage

Le point de référence d'échantillonnage est appelé point "B" et se trouve au niveau de la zone où le lac est le plus profond (Fig.14.). Dans le cadre de l'étude présentée dans l'article III des points d'échantillonnage supplémentaires ont été pris en compte afin d'analyser la variation de la diversité spatiale horizontale et verticale dans le lac du Bourget (se référer à la Fig. 1 de l'article III).



**Fig.14.** Le lac du Bourget. Le point « B » symbolise le site de référence.

## 2.3. Lac Léman

### 2.3.1. Caractéristiques

Le lac Léman (46°22'N, 06°28'E), appelé parfois lac de Genève, est en forme de croissant et se divise en deux unités géographiques distinctes: le Grand Lac et le Petit Lac. Sa superficie est de 580 km<sup>2</sup> dont 235 km<sup>2</sup> pour la France (Haute Savoie) et 345 km<sup>2</sup> pour la Suisse. Le Léman est de taille très modeste par rapport aux grands lacs nord américains ou africains, mais sa surface et son volume en font le plus important plan d'eau d'Europe Occidentale.

### 2.3.2. Historique

La qualité des eaux (la transparence, la chlorophylle *a*, la biomasse phytoplanctonique, la production primaire, les nutriments et l'oxygène, ..) du Léman est régulièrement suivie depuis 1960 sous l'égide de la CIPEL (Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman). Oligotrophe avant 1960, le Léman est devenu eutrophe dans les années 1970-80 pour retrouver actuellement un statut mésotrophe (Anneville, 2001). La CIPEL a mis au point un plan d'actions 2001-2010 dont les objectifs sont la lutte contre la pollution à la source, l'amélioration de l'assainissement dans son ensemble et la renaturation des cours d'eau. Ce lac est également sujet au problème de proliférations de *Planktothrix rubescens*, mais dans une moindre mesure comparativement au lac du Bourget (Jacquet et al., 2005a).

### 2.3.3. Echantillonnage

L'eau a été collectée au niveau du site d'échantillonnage de référence qui se trouve au point nommé "SHL2", qui est le point correspondant à la zone la plus profonde du lac (Fig. 15).

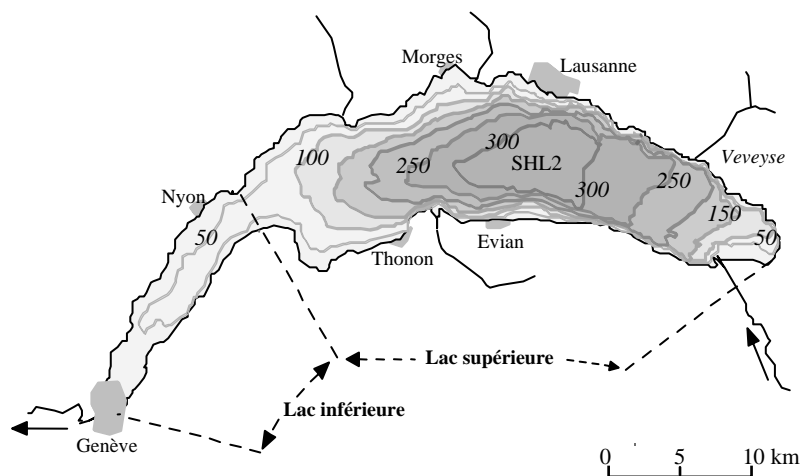


Fig. 15. La carte bathymétrique du lac Léman. La station « SHL2 » est notre site de référence.





-CHAPITRE III-

RESULTATS RELATIFS AUX TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

Ce troisième chapitre est consacré à la présentation de nos travaux de recherche. Nous étudions successivement la variabilité spatiale de la composition eubactérienne dans le lac du Bourget, la variabilité de la composition des communautés eubactériennes selon la saison, l'état trophique et la profondeur dans les lacs Léman, d'Annecy et du Bourget et enfin, la composition et diversité saisonnière des cyanophages dans le lac du Bourget. Ces problématiques ont fait l'objet de trois études séparées que nous insérerons dans le texte sous forme d'article acceptés ou soumis. Il s'agit de :

- II            Dorigo U., D. Fontvieille & J.F. Humbert. Spatial variability in the abundance and composition of the bacterioplankton community of the Lac du Bourget (France). **FEMS Microbial Ecology**. Soumis.
- III           Dorigo U., D. Fontvieille & J.F. Humbert. Comparative study on the composition of the freshwater eubacterioplankton community in three deep French Alpine lakes of different trophic status. **Limnology and Oceanography**. Soumis.
- IV           Dorigo U., S. Jacquet & J.F. Humbert. 2004. Cyanophage Diversity Inferred from g20 Gene Analyses in the Largest Natural French Lake, Lake Bourget. **Applied and Environmental Microbiology** 70, 1017-1022.

# **1. Article n° II : Spatial variability in the abundance and composition of the bacterioplankton community of the Lac du Bourget (France)**

## **1.1. Contexte de l'étude**

Le nombre de publications concernant la dynamique et la diversité des communautés microbiennes dans des écosystèmes naturels est en augmentation grâce à l'introduction récente des techniques moléculaires d'empreinte génétique. Cependant, dans la majorité de ces travaux, les stratégies d'échantillonnage et la représentativité d'un échantillon sont mal définis (Morris et al., 2002a). Alors qu'en milieu terrestre des données relatives à la variabilité spatiale de la diversité microbienne sont désormais disponibles (Ranjard et al., 2001; Nunan et al., 2002; Ranjard et al., 2003), un nombre très restreint d'informations concerne les écosystèmes aquatiques et notamment les grands lacs (Øvreås et al., 1997; Lindström, 1998).

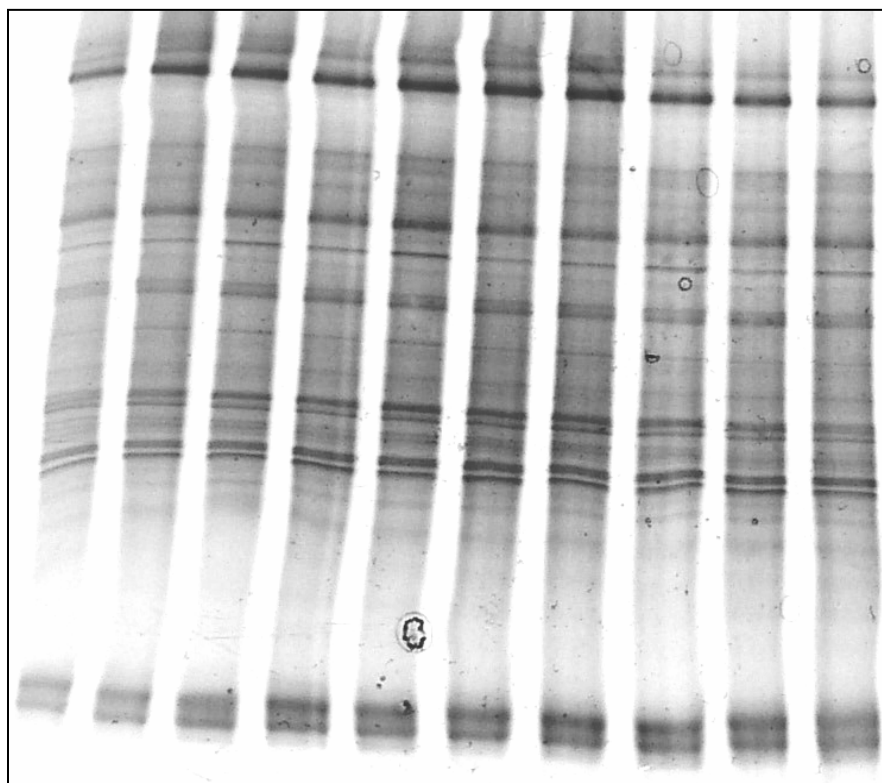
## **1.2. L'étude réalisée**

En 2003, nous avons analysé la variabilité spatiale de l'abondance et de la composition de la communauté eubactérienne du lac du Bourget, en hiver pendant la période de brassage des eaux et en été pendant la période de stratification de la colonne d'eau. Nous avons adopté une stratégie d'échantillonnage à deux dimensions en récoltant des échantillons d'eau à diverses profondeurs (entre 2 et 50 m) et à divers sites sur le lac. L'abondance de la communauté bactérienne a été mesurée par cytométrie en flux, alors que la composition eubactérienne de la fraction  $<2 \mu\text{m}$  a été analysée par la technique d'électrophorèse de gel en gradient de dénaturation (DGGE) suite à l'amplification d'ADN codant pour un fragment de la fraction de l'ARNr 16S par PCR.

## **1.3. La variabilité spatiale de la composition eubactérienne dans le lac du Bourget**

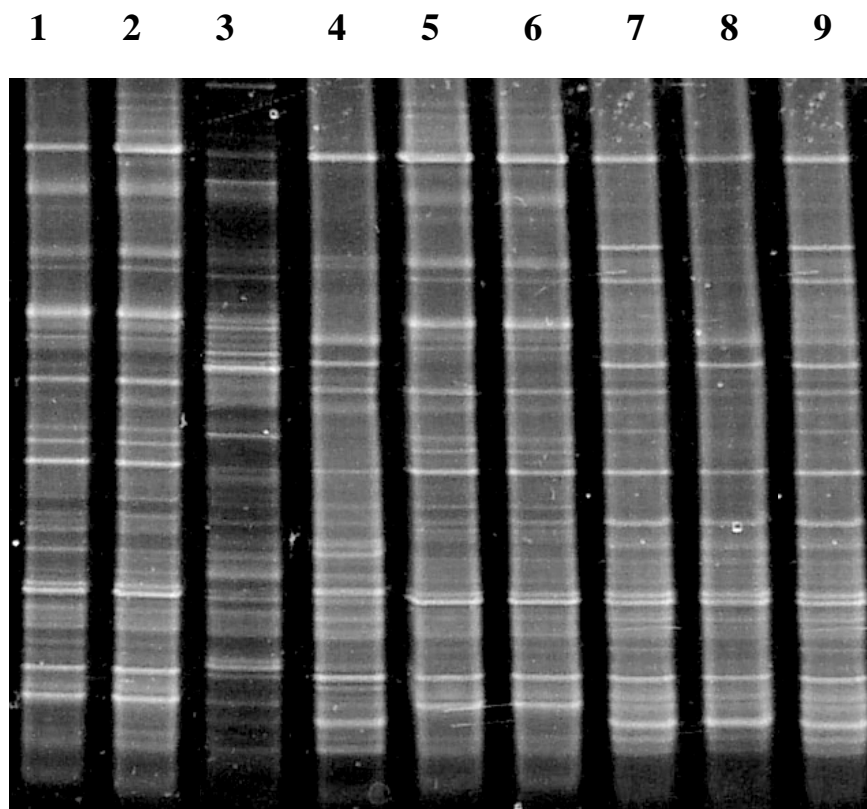
En hiver, pendant la période de brassage des eaux, on remarque une grande homogénéité spatiale (verticale et horizontale) de la composition de la communauté

bactérienne du lac, à l'exception des zones situées près des affluents. Le profil d'hiver, le plus fréquemment observé, est illustré en Fig.16.



**Fig. 16.** Profils de DGGE de 10 échantillons prélevés en janvier à différentes profondeurs et en différents points du lac.

En été, nous avons surtout observé des différences dans la composition eubactérienne selon une échelle verticale, en rapport avec la stratification thermique de la colonne d'eau (Fig.17). Plus exactement, il est apparu que l'épilimnion ne montrait pas de variations en terme de composition de la communauté eubactérienne, ni sur une échelle horizontale, ni sur une échelle verticale. En revanche au sein de l'hypolimnion deux types de profils ont été mis en évidence en fonction de la profondeur (30 ou 50 m) ; aucune différence n'existait à l'échelle horizontale. Enfin, les prélèvements à 15 m se montraient beaucoup plus hétérogènes sur une échelle horizontale en liaison avec des phénomènes hydrodynamiques et, plus précisément en raison de l'existence d'ondes internes, appelées seiches (Freissinet et al., 2004).



**Fig.17.** Image du gel de DGGE relatif à l'amplification en PCR de certains des échantillons prélevés en juin. 1 : B 0 m; 2, B 2 m : 3, B 30 m; 4 : B 50 m; 5 : B10 m; 6 : B20 m; 7 : B1 15 m; 8 : B2 15 m et 9 : B 15 m. Les profils 1, 2, 5 et 6 correspondent à des prélèvements dans l'épilimnion ; les profils 7, 8 et 9 au métalimnion et les profils 3 et 4 à l'hypolimnion.

En conclusion, ces résultats montrent que l'essentiel de la diversité dans la composition de la communauté eubactérienne du lac du Bourget se situe sur l'échelle verticale. D'un point de vue pratique, ces résultats suggèrent qu'un seul point d'échantillonnage sur le lac peut être suffisant pour une estimation fiable et représentative de la diversité microbienne au sein du lac du Bourget dans son ensemble. Cependant, ce point doit se situer en dehors des zones pouvant connaître des apports très ponctuels de bactéries allochtones telle que l'embouchure des tributaires. Ces résultats montrent aussi que le choix des profondeurs échantillonnées a une grande importance sur la composition des communautés. Si dans l'épilimnion aucune différence n'est observée en raison du brassage permanent de cette couche d'eau, il n'en est pas de même pour l'hypolimnion. La localisation du métalimnion dans la colonne d'eau est quant à elle très dépendante de phénomènes hydrodynamiques ce qui nécessite d'établir un profil thermique si l'on veut échantillonner dans cette zone. Ces observations étaient nécessaires avant de mettre en place des l'études

comparatives de la composition eubactérienne dans les grands lacs Alpains français (Annecy, Bourget et Léman).



## Spatial variability in the abundance and composition of the bacterioplankton community of the Lac du Bourget (France)

Ursula Dorigo, Dominique Fontvieille and Jean-François Humbert

*UMR CARTELE (INRA / Université de Savoie), Laboratoire de Microbiologie Aquatique,  
BP 511, 74203 Thonon Cedex, France*

**Abstract:** Spatial variations in abundance and diversity of the eubacterioplankton community of a great Alpine lake, the Lac du Bourget (France) were investigated by two 2-dimensional samplings performed in 2003. Lake-water samples were collected in winter during holomixis and in early summer during water stratification. The population abundance of each sample was determined by flow cytometry. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments from organisms smaller than 2  $\mu\text{m}$  was used to assess eubacterioplankton community composition. In winter, no obvious differences were observed in either the abundance or the diversity of the eubacterial community, both on the horizontal and the vertical scales. The only influence detected was that of river water input, but at a very minor scale relative to the lake surface. In early summer, changes were found in the community composition at the vertical scale according to the thermal stratification of the water column. But, there were also strong differences at the horizontal scale at 15 m depth due to internal waves. Consequences of all these findings in terms of sampling strategies are very important from the perspective of comparative studies of bacterial community diversity and functioning in large and deep lakes.

**Keywords:** Great lake, sampling strategy, bacterioplankton community abundance, bacterioplankton community diversity, spatial variability



## 1. Introduction

Since the 1980s, there has been a steady increase in the number of publications about evaluating the dynamics and diversity of microbial communities in natural ecosystems [1]. This subject has attracted considerable research, because new molecular tools now make it possible to evaluate these descriptors more effectively, and because there is a wide debate within the scientific community about the origin and the functional importance of biodiversity in ecosystems (e.g. [2]). However, as pointed out in the review paper performed by Morris *et al.* [1], in the vast majority of these studies, sampling strategies and sample representativity were not clearly defined. Without data about the repeatability of the evaluation or the intra-community variability, and by considering only one or two sampling points without knowing whether they are representative of the whole ecosystem studied, it is very difficult to interpret the eventual differences in eubacterial community compositions when several ecosystems are compared.

Whereas more and more data are becoming available about the spatial variability of the microbial diversity in soil ecosystems, investigated at various scales (e.g. [3-5], only a handful of data are available about aquatic ecosystems and, in particular, for freshwater systems, such as great lakes [6, 7]. Differences in bacterioplankton dynamics and composition may be found at a very small scale as a result of the formation of microscopic or macroscopic organic aggregates [8, 9]. Furthermore, the importance of the influence of the littoral zone or of a river mouth on the bacterioplankton community composition is not fully understood, whereas the input of allochthonous bacteria in modifying the bacterioplankton composition could be very considerable in these areas. Lindström [10] showed that in a small mesotrophic lake, changes in the bacterioplankton composition could be explained by the massive influx of allochthonous bacteria after heavy rainfalls in the near catchment area. Similarly, differences in the horizontal or vertical distribution of phytoplankton due to thermal stratification of the water column or to a bloom event, for example, can potentially influence the spatial dynamic and composition of the bacterioplankton community [11-13]. So far, little has been discovered about the horizontal changes in the distribution of bacterioplankton [14], whereas more attention has been paid to investigating the distribution along the depth profile [1, 15-17]. Palmer *et al.* [18] indicated patchiness in the distribution patterns of bacterioplankton based on plate counts both on the small scale (<1 mL), and the large scale (> 1-m horizontal distance), and differences along the depth profile during water stratification. It would appear that horizontal differences are generally less marked than vertical differences, and that the

same bacterial assemblages occupy the same depth over large distances along the Catalan coast [19]. On the other hand, Yannarell and Triplett [14] investigated the within- and between-lake variability of the composition of the epilimnic bacterioplankton community using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA), and found significant horizontal heterogeneity at the scale of hundreds of meters in some lakes.

In the global context of our studies comparing heterotrophic bacterioplankton diversity and dynamics, and their influence on nutrient cycling in three great sub-alpine lakes (Annecy, Bourget and Lemane) that are characterized by different trophic levels (ranging from oligotrophic to meso-eutrophic), we sought first to investigate the horizontal and vertical distribution of the bacterioplankton community in one of these lakes, the Lac du Bourget. To do this, we performed a 2-dimensional sampling in winter when there was no thermal stratification in the water column, and in summer when the water column was stratified. The abundance of heterotrophic bacteria in each sample was evaluated by flow cytometry analysis, whereas species diversity was estimated by DGGE analysis of a 550-bp fragment of the 16S rRNA gene. Previous research had demonstrated that DGGE is an appropriate technique to use to investigate the temporal and spatial dynamics of major species in aquatic bacterioplankton communities [14, 17, 19].

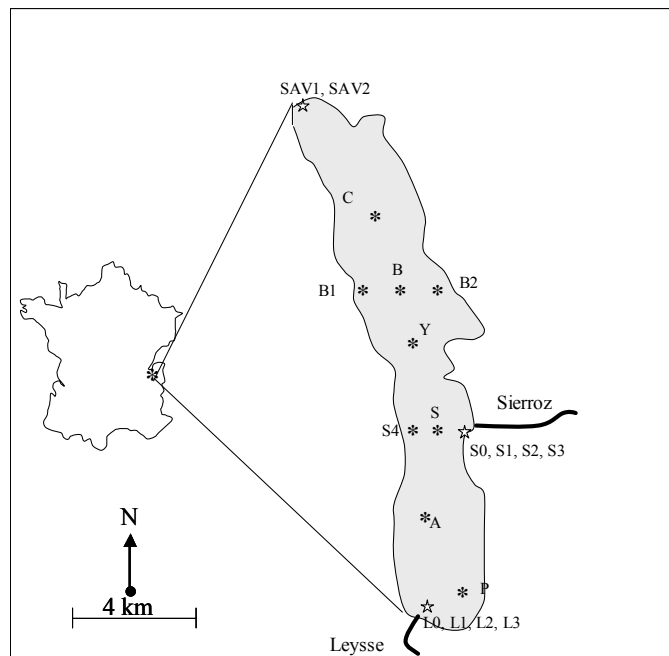
## 2. Experimental procedures

### 2.1. Site description

The Lac du Bourget is the largest natural French lake, and is located in Eastern France, on the edge of the Alps. It is a warm, mesotrophic, meromictic and elongated (18 and 3 km in length and width respectively), north-south orientated lake, with a surface 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 and 80 m respectively, and a water residence time of approx. 10 years. The lake exhibits summer stratification, and since 1984 the mean water temperature has been  $6.4^\circ\text{C}$ , with temperatures of up to  $27^\circ\text{C}$  in the first few centimeters during summer. Despite attempts to reduce the phosphorus content (between 1980 and 2001 the level has fallen from 120 to  $26 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), since 1996 blooms of the filamentous and hepatotoxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* have occurred at least during the summer and autumn periods [20]. A maximum cell concentration of 76,000 cyanobacterial cells. $\text{mL}^{-1}$  was found in 1997.

## 2.2. Field sampling strategy

Lake-water samples were collected at the same stations in the Lac du Bourget during the winter (15 January 2003), when the water mass was mixed, and in early summer (26 June 2003), when the water column was completely stratified. These stations were sampled across a North-South transect, two East-West transects and three areas of interest, *i.e.* in the proximity of the two main tributaries of the lake (the Leysse and Sierroz rivers, with average flow rates of 8.5 and 3.5 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>, respectively) and near the outlet (Canal de Savière) of the lake, characterized by the presence of reed beds (Fig. 1 and Tab. 1). In January and in June, samples were collected over a 3-h interval (from 11.30 a.m. to 2.30 p.m.). 500 ml were collected in bottles, which were previously autoclaved and rinsed with water from each sample. Sampling was performed at 0 and 15 meters at most of the sampling stations. At 5 sampling stations located on the North-South transect, additional samples were collected at depths of 2, 30 and 50 m. These depths were chosen because they are located in the different thermal layers of the water column. In order to estimate spatial variability in the distribution of bacterioplankton at a minor scale, in January we collected five additional surface water samples from just around our 4-m boat. All samples were kept at 4°C and in the dark until further processing in laboratory.



**Fig. 1.** Diagram showing Lake Bourget and the location of the sampling stations along the North-South transect and the two East-West transects. Multiple sampling stations within areas of major interest, near the river inlets and the lake outlet, are indicated by stars. See Tab. 1 for the localization of the points.

**Tab 1.** Characteristics of samples used to investigate spatial differences among the study areas. Sampling at 8 m was done at a point that was too shallow to permit analyses at 15 m.

| <b>Sample name</b> | <b>Date</b> | <b>Position</b>     |           | <b>Depth (m)</b> |
|--------------------|-------------|---------------------|-----------|------------------|
| <b>SAV1</b>        | 15/JAN/03   | N45°48,252          | E5°49,590 | 0                |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0                |
| <b>SAV2</b>        | 15/JAN/03   | N45°48,151          | E5°49,765 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>C</b>           | 15/JAN/03   | N45°46,527          | E5°50,970 | 0, 2, 15, 30, 50 |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 2, 15, 30, 50 |
| <b>B1</b>          | 15/JAN/03   | N45°44,776          | E5°52,467 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>B</b>           | 15/JAN/03   | N45°44,800          | E5°51,605 | 0, 2, 15, 30, 50 |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 2, 15, 30, 50 |
| <b>B2</b>          | 15/JAN/03   | N45°44,826          | E5°50,813 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>P</b>           | 15/JAN/03   | N45°39,606          | E5°52,531 | 0, 2, 15, 30, 50 |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 2, 15, 30, 50 |
| <b>L</b>           | 15/JAN/03   | N45°39,369          | E5°52,046 | 0                |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0                |
| <b>L1</b>          | 15/JAN/03   | N45°39,401          | E5°52,075 | 0                |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0                |
| <b>L2</b>          | 15/JAN/03   | N45°39,421          | E5°52,163 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>L3</b>          | 15/JAN/03   | N45°39,454          | E5°52,185 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>LE</b>          | 26/JUN/03   | Mouth of the Leysse |           | 0                |
| <b>Y</b>           | 15/JAN/03   | N45°43,533          | E5°52,152 | 0, 2, 15, 30, 50 |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           |                  |
| <b>S0</b>          | 26/JUN/03   | N45°42,088          | E5°52,972 | 0                |
| <b>S1</b>          | 15/JAN/03   | N45°42,089          | E5°52,893 | 0, 8             |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 8             |
| <b>S2</b>          | 15/JAN/03   | N45°42,108          | E5°52,918 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>S3</b>          | 15/JAN/03   | N45°42,104          | E5°52,904 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>S</b>           | 15/JAN/03   | N45°42,110          | E5°52,239 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>S4</b>          | 15/JAN/03   | N45°42,092          | E5°51,882 | 0, 15            |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 15            |
| <b>A</b>           | 15/JAN/03   | N45°41,016          | E5°52,167 | 0, 2, 15, 30, 50 |
|                    | 26/JUN/03   |                     |           | 0, 2, 15, 30, 50 |

### 2.3. Collection of environmental data

At point B, by means of a fluoroprobe (BBE Fluoroprobe) we recorded the vertical profiles of temperature and depth in order to confirm water holomixis in winter and water

stratification in summer [21]. Water subsamples were also taken at point B, on 15 January (2, 6, 10, 15, 20, 30 and 50 m) and 26 June (2, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 40 and 50 m), and were used to analyze standard nutrients (TOC, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, total nitrogen, total phosphorus, Ppart and SiO<sub>2</sub>). Chemical analyses were done as soon as the samples reached the laboratory and were carried out in accordance with standard French procedures and protocols (AFNOR).

#### 2.4. Flow cytometry analyses

Subsamples of each sample were prepared and used to determine the bacterial abundance. Briefly, 1 mL of the < 2 µm fraction was preserved by adding 0.2 µm-filtered glutaraldehyde at a final concentration of 1%. Samples were stored at 4°C for no more than 1 day until being counted using a FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer equipped with a blue laser beam fixed at 488 nm and with the original filter set up. For the analysis of heterotrophic bacteria, the samples were diluted 50-fold with water from the lake sampled the same day, and subjected to 0.2-µm filtration. The samples were then stained using the nucleic acid dye SYBR Green I (Molecular Probes, 1:10,000 final concentration), and left in the dark for 15 min before being analyzed by flow cytometry following procedures outlined by Marie *et al.* [22]. Cellular parameters were determined relative to the values found for 1-µm beads (Molecular Probes). Data were collected in listmode files, and then analyzed using CYTOWIN ([23]; available at <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html>).

#### 2.5. Bacterioplankton DNA collection and extraction

250 mL of each lake-water sample was vacuum-filtered through a 2-µm pore-size polycarbonate membrane prefilter (Nuclepore) to eliminate larger eukaryotes (phytoplankton and zooplankton whose chloroplastidial or mitochondrial 16S rRNA gene would be amplified by the PCR primers used). This pre-filtration step also excluded filamentous and particle-associated bacteria. The microbial biomass was then collected and trapped on 0.2-µm pore-size polycarbonate membrane filters (Nuclepore), which were placed in Eppendorf microtubes and which received 750 µl of 55°C pre-warmed lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.75 M sucrose). The filters were frozen at -80°C until the nucleic acid extractions could be carried out. In January, it took 1 day to filter 50 samples, whereas in June it took 4-5 days to filter 55 samples, due to the higher microorganism content in the summer.

Nucleic acid extraction was performed as described in Massana *et al.* [24] with little modification. Briefly, filters in the lysis buffer were placed in a water bath at 55°C for 2 min, vortexed and placed in a sonication bath for 2 min. Lysozyme (Eurobio, 20000 U/mg, 2.4 mg.mL<sup>-1</sup> final concentration) was then added to the filters, and filters were incubated at 37°C for 45 min with gentle stirring (200 g). Subsequently, SDS (sodium dodecyl sulfate, 1% final concentration) and proteinase K (Eurobio, 30 mU/mg, 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> final concentration) were added, and the filters were incubated at 55°C for at least 90 min. The lysates were transferred to a fresh Eppendorf tube, and purified twice by sequential extraction with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 vol/vol/vol, pH 8), and finally an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1 vol/vol). The purified nucleic acids in the aqueous phase were then precipitated by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate (pH 5.2) plus two volumes of cold 99.5% ethanol, stored overnight at -80°C and centrifuged (21,000 g, 30 min). The pellet was washed with 300 µl of 80% ethanol, re-centrifuged and re-suspended in 30-100 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). The integrity of total DNA was checked by agarose gel electrophoresis, and quantified by determining the absorbance at 260 nm. Extraction yields were between 38 and 100 µg of DNA per liter of sample in January, and between 35 and 180 µg DNA per liter of sample in June. DNA was stored at -80°C until analyzed.

#### 2.6. PCR amplification of a 16S rRNA gene fragment

PCR amplifications were performed in 50-µl volumes containing 60 ng of extracted DNA, a 10X *Taq* reaction buffer (Eurobio), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 120 µM of each deoxynucleotide, 1 µM of each primer targeting the 16S rDNA (358-907 positions on 16S rDNA, *Escherichia coli* numbering), bovine serum albumin (Sigma, 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> final concentration), and 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Eurobluetaq, Eurobio). Occasionally it was difficult to obtain enough product for DGGE analysis from the PCR reaction. In these cases the amount of DNA was increased from 60 to 120 ng per 50-µl reaction. The primer combination of Eubacterial-specific primer 358f-GC [25] and universal primer 907rM [26] yielded a DNA fragment of ca. 550-bp. Initially, two distinct thermal cyclers, the Thermal Cycler T-Personal (Biometra) and the PTC-100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (MJ Research INC.) were used, and the DGGE patterns obtained were compared on a DGGE gel. After comparing the PCR amplification efficiency (higher efficiency for the Biometra cycler), and the DGGE profiles (the same for the two cyclers), all PCR reactions were performed using the Biometra cycler. For each set of

reactions, a negative control, in which the template was replaced by an equivalent volume of sterile deionized water, was included. PCR reactions were carried out as described in Schauer [19]. The temperatures were as follows: 1 denaturing step at 94°C for 5 min, 10 touchdown cycles of 94°C for 1 min, 65°C for 1 min (decreasing 1°C each cycle), and 72°C for 3 min, followed by 20 standard cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 3 min then a final extension step of 72°C for 5 min. The presence of PCR products and their correct size was confirmed by analyzing 4 µl of product on a ethidium-bromide stained 1.2% (w/vol) agarose gel in 1X TBE buffer (89 mM Tris-base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0).

### 2.7. *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)*

DGGE analysis was performed by using the CBS-DGGE 2000 system (C.B.S. Scientific, company, INC.). DGGE was performed essentially as described in Schauer [19]. Briefly, PCR products were separated on a 1-mm thick, vertical gel containing 6% (w/vol) polyacrylamide (37.5:1 acrylamide:bisacrylamide) and a linear gradient of the denaturants urea and formamide, increasing from 40% at the top of the gel to 80% at the bottom (the 100% denaturant was defined as 7 M urea and 40% vol/vol formamide). As the PCR amplification efficiency was the same for all samples, 40 µl of the PCR product were applied to individual lanes in the gel. Electrophoresis was performed in 1X TAE buffer (40 mM Tris acetate, pH 7.4; 20 mM sodium acetate; 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA;) at 60°C and a constant voltage of 100 V was applied to the submerged gel for 16 h. Nucleic acids were visualized by staining for 45 min in 1X TAE buffer containing Sybr<sup>®</sup>Gold (1:5,000 final concentration; Molecular Probes), rinsed in distilled water, and removed from the glass plate to a UV-transparent plate, visualized on a UV transilluminator (Tex-35M, Bioblock Scientific) and numerized using a Kodak DC290 camera. The gel images were then saved and further analyzed using Microsoft Photo Editor software.

### 2.8. *DGGE data analysis*

Gel images were adjusted for contrast and gray balance before analysis. A DGGE gel is composed of several lanes, each lane corresponding to one sample and consisting of several bands at distinct positions with different intensities. If visual examination was not sufficient, DGGE banding patterns were converted to a binary table using GeneTools software (SynGene, Cambridge, England) to facilitate comparison between samples. Two tables were

constructed (with samples as rows and DGGE bands as columns), the first took into account the presence or absence of a nucleic acid band at a given height in each lane (scored as 1 or 0, respectively), and the second took into account the relative intensity of each band (scored 3, 2, 1 or 0). Both matrices were used to perform cluster analysis computing hierarchy based on the Ward method was then performed, using the ADE-4 Software Package [27].

Pairwise similarity values were calculated using the Sorensen's index :  $C_s = 2j/(a+b)$ , where  $j$  stands for the number of common phylotypes (bands) in sample A and B,  $a$  is the number of phylotypes in sample A, and  $b$  the number of phylotypes in B [28, 29]. A similarity value of 1 indicates that two DGGE band patterns are identical, and on the contrary a value of 0 indicates that no bands are shared. Pairwise similarity matrices were constructed to quantify the similarities between DGGE patterns along the depth profile in June, and the similarities between each depth profile in June and the common January DGGE profile.

### *2.9. Preliminary experiments*

Several preliminary tests were performed to identify the various aspects that have to be taken into account before the Bourget samples were analyzed. Generally speaking, variability in DGGE fingerprints could be introduced by the amount of water filtered and thus the amount of microbial biomass collected, and by bias during DNA extraction or amplification. Finally, typical biases inherent in the DGGE technique should be considered. A first experiment was conducted to find if the amount of water filtered may have an influence on the DGGE profile; this was determined by filtering decreasing volumes of the same water sample (1000, 500, 250, 110, 70, 50 and 35 mL) and by assessing the DGGE profile once each filter had undergone DNA extraction and PCR amplification. No discrepancies were observed, and we finally decided to filter 250 mL each time water samples were analyzed.

A second experiment was done to test the reproducibility of the different steps in the technique. Therefore, in January, five samples were filtered twice on separate filters in order to test the repeatability of the filtration, amplification and DGGE steps. The duplicate filters were processed in parallel (independent filtration, extraction and amplification) and gave identical DGGE patterns on the same DGGE gel.

A third experiment involved storing 4 samples collected at 2, 15, 30 and 50 m depth, for a period of 9 days at 4°C and analyzing them at t0, t1, t3, t6 and t9 (days). We were interested in finding out whether the composition of the microflora changes during prolonged storage at 4°C. The DGGE patterns were shown to be identical throughout the 9 days the



samples remained in the fridge, whereas the cytofluorometry signature changed after 6 days becoming uninterpretable. This experiment was particularly important, because in June filtration continued for several days. Finally, we checked the degree of reproducibility between replicate samples on the same gel and on different gels. Each microbial assemblage produced a reproducible DGGE fingerprint when run within the same gel; in parallel gels differences were sometimes observed in terms of the presence/absence of minor bands, and sometimes in terms of the migration distance of two bands. These differences were probably related to the quality of the gel. Consequently, as samples run in different DGGE gels are difficult to compare, two strategies were adopted to compare samples run in different gels. Firstly, at least one or if possible two reference samples were loaded onto each gel each time, secondly, samples were grouped together in order to make comparison easier, *e.g.* for each sampling date all surface samples were grouped together on the a first gel in order to investigate eventual horizontal differences at this depth, then all 15-m samples were run on a second gel and so on, and finally, vertical differences were investigated by running samples taken at different depths of the same sampling station on another gel.

### 3. Results

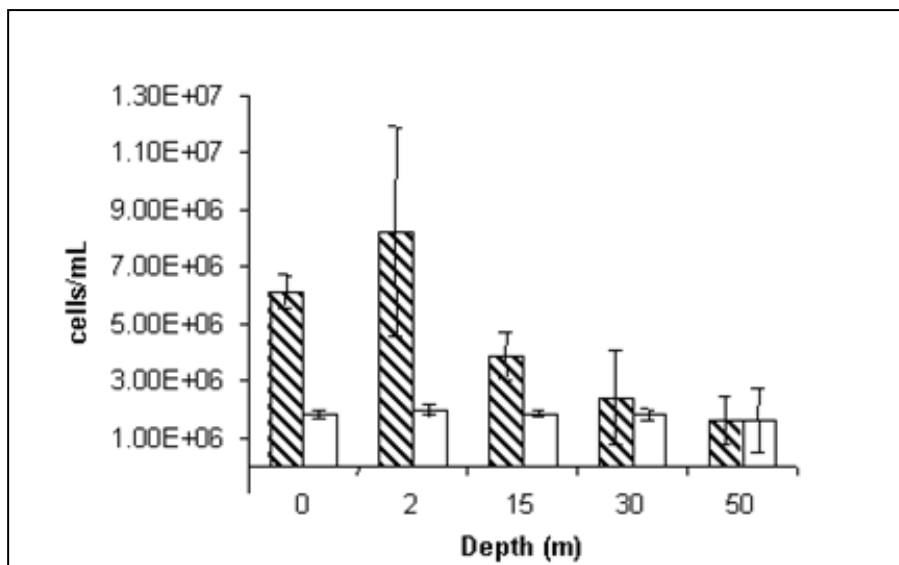
#### 3.1. CFM counts

In January, bacterial counts ranged between  $0.7E+06$  and  $2.2E+06$ , with a global average of  $1.82E+06$  ( $\pm 0.28E+06$ ) cells.mL<sup>-1</sup> (Fig. 2). There was no significant difference (Kruskall-Wallis test,  $P < 0.05$ ) between samples with regard to the depth (0, 2, 15, 30 and 50 m) or to the sampling point. The two lowest bacterial abundances were observed at the sampling points located near the tributaries (L0 and S1).

In June, bacterial counts ranged between  $1.1E+06$  and  $12.5E+06$ , with an average of  $4.95E+06$  ( $\pm 2.49E+06$ ) cells.mL<sup>-1</sup>, and there was a significant difference (Kruskall-Wallis test,  $P < 0.05$ ) between samples with regard to depth (0, 2, 15, 30 and 50 m) (Fig. 2). Some significant differences (Mann-Whitney U test,  $P < 0.05$ ) were observed in the cell counts with regard to both the horizontal and vertical scales. Firstly, there was a significant increase in the bacterial counts from the hypolimnic layer samples (30 and 50 m depth) to the epilimnic layer samples (0 and 2 m). Bacterial counts in samples taken at 15 m depth were intermediate, but significantly different (Mann-Whitney U test,  $P < 0.05$ ). Secondly, there was a small but significant difference (Mann-Whitney U test,  $P < 0.05$ ) in the epilimnic layer (0 and 2 m)

between cell counts for the sampling points located away from the edges of the lake, those in the North of the lake (SAV1, SAV2, C, B, B1 and B2) showing greater abundances than those located in the South (S, S1, S2, S3, S4, A, P, L1, L2, L3). No significant horizontal differences were recorded for the other layers, and the sampling points located near the tributaries were not different from the other points.

Finally, when comparing bacterial cell counts in January and in June, it appears 1) that there was no significant difference between the cell counts at the 30 and 50 m depths in June and any of the samples counted in January, and 2) that the variance of the average total cell count at each depth was greater in June than in January.

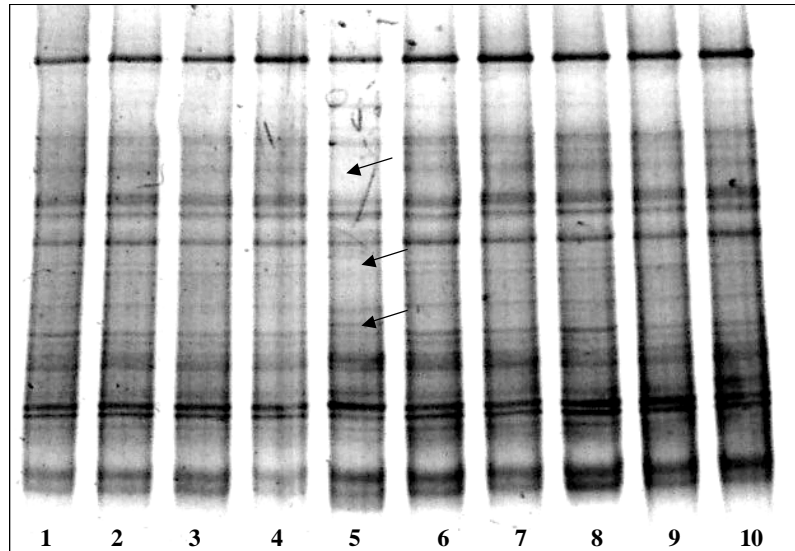


**Fig. 2.** Average total cell counts (+/- error bars indicating standard deviations) of the non-photoautotrophic bacterioplankton community in January (white) and in June (striped) in lake Bourget at 0, 2, 15, 30 and 50 m. Counts were made by FCM analysis of SYBR Green I stained cells.

### 3.2. DGGE fingerprint analyses

In January, forty-four of the 49 samples were characterized by having the same DGGE band pattern (100% homology). From up to now we will refer to this DGGE band pattern as the “common January profile” (all profiles in Fig. 3, except A 50 m). Among the remaining 5 samples, B1 15 m, Y 30 m, A 50 m showed differences in the intensity of 1, 2 or 3 bands, respectively (Fig. 3 for A 50 m, the rest not shown) whereas S1 0 m and L 0 m which were taken in the vicinity of the two tributaries, were characterized by one extra band (not shown) and by a very different DGGE pattern showing some common (8) and some different bands

(6) compared to the common January profile, respectively (L 0 m in Fig. 4). Additional samples, which were taken some weeks later (precisely in February near the Leysse river) corroborate these initial observations (results not shown). Finally, on a small spatial scale the DGGE pattern of the samples collected around the boat, were identical to the common January profile.



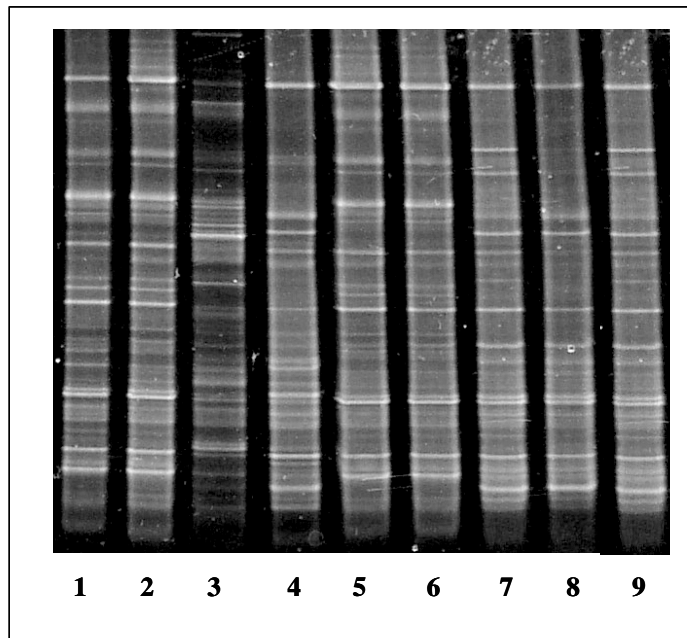
**Fig. 3.** Negative image of a DGGE gel of PCR amplified 16S rDNA fragments (position 358-907) for some January samples. Lane 1-5: A 0, 2, 15, 30 and 50 m; lane 6-10: P 0, 2, 15, 30 and 50 m. All samples except A 50 m (arrows show differences in band intensity), showed the common January DGGE profile.

**Fig. 4.** Negative image of a DGGE gel of PCR amplified 16S rDNA fragments (position 358-907) for the L 0 m sample which was taken in the outlet of the Leysse river (lane 2), compared to the common January DGGE profile (here B2 0 m, lane 1).

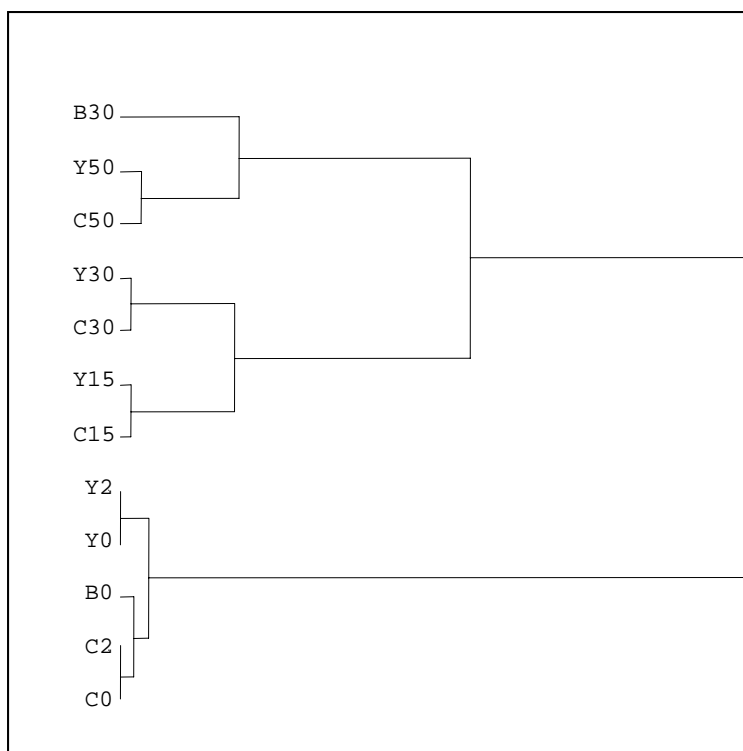


In June, high horizontal homogeneity was observed for the entire lake with regard to the sampling depth at depths of 0, 2, 30 and 50 m, but not at the 15-m depth. Fig. 5 refers to some of the 55 samples analyzed. Hence, the DGGE profiles were the same for all the

samples taken in the epilimnic layer at depths 0 and 2 m (referred to as “the common epilimnion profile”). On the other hand, in the hypolimnic layer, samples taken at 30 and 50 m depths were characterized by two different DGGE band patterns. At a depth of 30 m, all the profiles were the same (referred to as “the common 30-m profile”), apart from point B, which showed 5 additional bands. At the 50-m depth, all the profiles were the same (referred to as “the common 50-m profile”), apart from point P, which displayed 1 additional band. The cluster analysis applied to the presence/absence of bands within each of the samples from stations C and Y at the 0-, 2-, 15-, 30- and 50-m depths, and from station B at 0 and 30 m highlights the influence of the depth on the bacterioplankton community composition: the epilimnion samples (0 and 2 m) clustered together, as did the metalimnion, the 30-m and the 50-m samples, except B 30 m which was divergent from the C and Y samples taken at the same depth (Fig. 6).

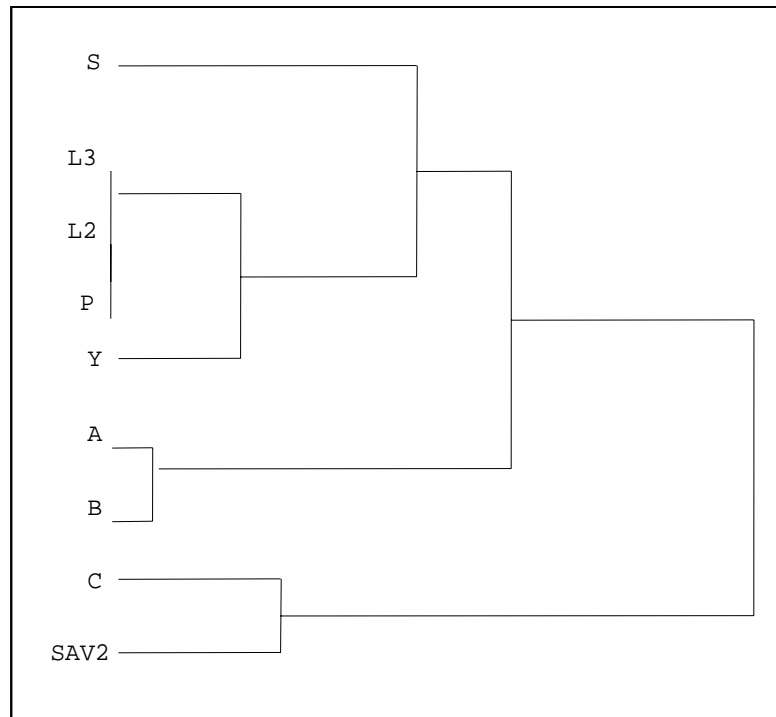


**Fig. 5.** Image of a SybrGold-stained DGGE gel containing PCR-amplified segments of 16S rRNA genes, showing the fingerprints of some June stations. Lane 1, B 0 m; lane 2, B 2 m; lane 3, B 30 m; lane 4, B 50 m; lane 5, B1 0 m; lane 6, B2 0 m; lane 7, B1 15 m; lane 8, B2 15 m and lane 9 B 15 m. Lanes 1, 2, 5 and 6 correspond to the common epilimnion DGGE profile; lanes 7, 8 and 9 show samples collected within the metalimnion; lane 4 shows the common 50-m hypolimnion profile (verified by another gel); lane 3 shows a sample which differed compared to the common 30-m hypolimnion profile (verified by another gel).



**Fig. 6.** Cluster analysis of June profiles obtained for sampling stations C and Y at depths of 0, 2, 15, 30 and 50 m, and for B at depths of 0 and 30 m. The epilimnic layer (0 and 2 m) clustered together and so did the deeper samples.

As already stated, samples taken within the metalimnic layer at the 15-m depth showed great heterogeneity in DGGE band position and intensity, depending on the sampling point. From the cluster analysis based on the relative intensity of each band, we showed that there was a difference in the community structure depending on the geographical position of the sampling sites. More precisely, along the North-South transect, the more eastern samples clustered together and so did the more western ones. (Fig. 7). More generally, apart from the 15-m sample from B, which was very different from the other samples taken at this depth, the 15-m DGGE band patterns were more similar to the 30 m pattern than to the pattern from the epilimnion (some samples shown in Fig. 5).



**Fig. 7.** Cluster analysis of the heterogeneous DGGE profiles relative to samples collected along the North-South transect at a depth of 15 m during the June campaign. Resemblance among DGGE profiles might be explained by the geographical position of the samples.

Table 2 shows a matrix intended to analyze the pairwise similarities ( $C_s$ ) between each of the depth layers at station P and a representative of January samples (C 0 m). The cluster analysis (Fig. 6) also suggests that resemblance between June samples was greatest for samples within the epilimnion, and that samples from hypolimnion were more similar to those collected within the metalimnion than within the epilimnic layer. The highest and the lowest values between any two June samples were 1 and 0.63, respectively, indicating that the communities were not drastically different. Table 2 also shows that the January assemblage was not dramatically different from the one found in June at depths from 0 to 50 m, with  $C_s$  values ranging from 0.70 to 0.88. When pairwise similarities were calculated between the January and June samples, it emerged that the January DGGE profile showed greatest similarities with the June profile for the samples taken at 15 or 30 m depths. Cluster analyses of the fingerprints of this gel corroborate these results (data not shown).

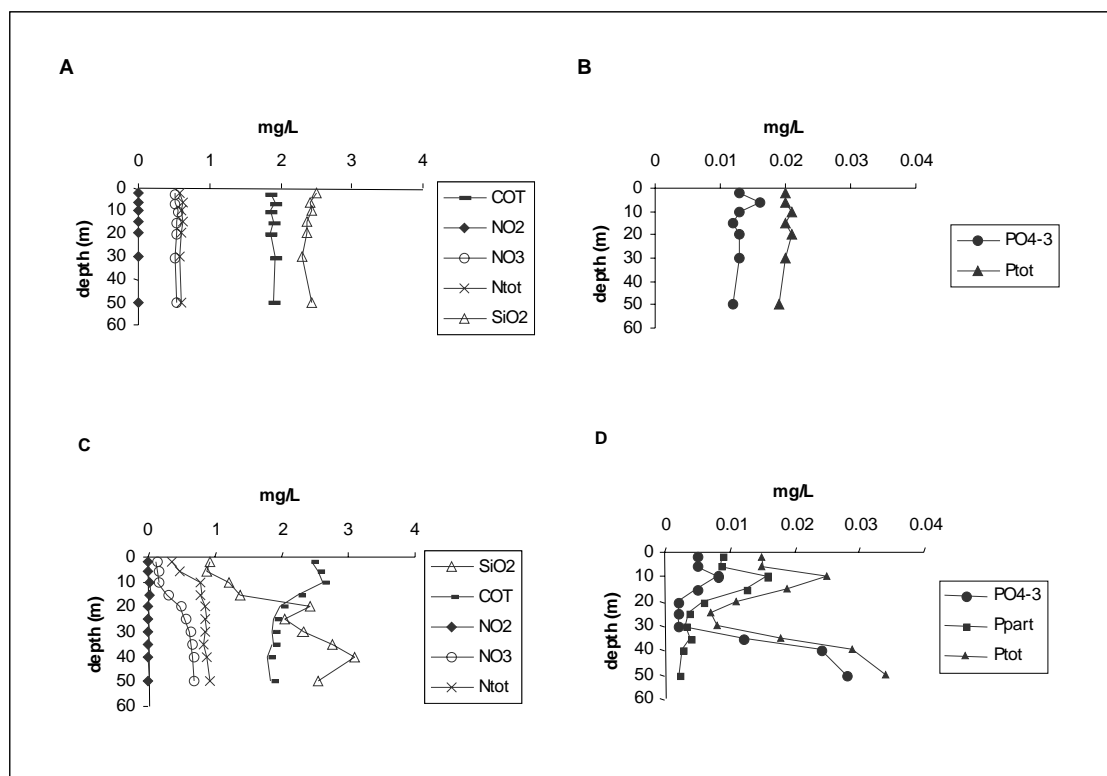
**Tab 2.** Similarity (Cs) matrix shown as Sorensen’s similarity index for bacterioplankton communities collected at 0, 2, 15, 30 and 50 m depths in June and at 0 m depth in January, which was the common winter profile shared by most of the winter samples. It appears firstly that in June the epilimnion samples (0 and 2 m) were grouped together, secondly that the metalimnion samples (15 m) were closer to the hypolimnion samples (30 and 50 m) than to those of the epilimnion, and finally that the January profile was closer to the June hypolimnion samples than to those collected into the upper layer.

|                     | <b>C0 m</b>    | <b>P0 m</b> | <b>P2 m</b> | <b>P15 m</b> | <b>P30 m</b> | <b>P50 m</b> |
|---------------------|----------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|                     | <b>January</b> | <b>June</b> | <b>June</b> | <b>June</b>  | <b>June</b>  | <b>June</b>  |
| <b>C0 m January</b> | -              | 0.76        | 0.76        | 0.88         | 0.80         | 0.70         |
| <b>P0 m June</b>    |                | -           | 1           | 0.86         | 0.66         | 0.63         |
| <b>P2 m June</b>    |                |             | -           | 0.86         | 0.66         | 0.63         |
| <b>P15 m June</b>   |                |             |             | -            | 0.91         | 0.81         |
| <b>P30 m June</b>   |                |             |             |              | -            | 0.91         |
| <b>P50 m June</b>   |                |             |             |              |              | -            |

#### 4. Discussion

The goal of this study was to assess the horizontal and the vertical variations in the abundance and composition of the bacterioplankton community in a large alpine lake, the Lac du Bourget. Two contrasting seasons were studied in order to assess the importance of the stratification of the water column on these spatial differences.

Firstly, it appeared that in January the bacterioplankton community of the Lac du Bourget was homogeneous in terms of both abundance and species composition. The chemical parameters did not vary regarding to the depth (Fig. 8). These findings are consistent with the mixing of the water column in winter. Bacterial abundances showed a great homogeneity with regard to the depth and location of the sampling points within the lake. In the same way, the DGGE band patterns were remarkably homogeneous, since only 5 out of the 49 profiles studied were different. From 14 to 20 bands were recorded in these DGGE patterns, which is consistent with previous findings for freshwater bacterial assemblages. Casamayor *et al.* [30] reported a total of between 8 and 17 bands in Lakes Cisó and Vilar. Similarly, Lindström and Bergström [31] found 18 to 25 bands per sample in two Swedish lakes.



**Fig. 8.** Vertical distribution of  $\text{SiO}_2$ , COT,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , Ntot,  $\text{PO}_4^{-3}$ , Ptot in January (A and B) and  $\text{SiO}_2$ , COT,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ , Ntot,  $\text{PO}_4^{-3}$ , Ppart, Ptot in June (C and D). In January, chemical analyses showed a homogeneous water mass, apart from the peak in phosphates at the 6-m depth. In June, conditions were no more homogeneous (see text).

At three sampling points, only small differences were observed in the relative intensity of the DGGE bands. As suggested by Murray *et al.* [29], there is a relationship between band intensity and the relative abundance of DNA from that phylotype in the template mixture, reflecting the relative abundance of each species within complex assemblages. However, there are many concerns about translating band intensity into relative abundance. Variation in 16S rRNA gene copy numbers [32], PCR biases (inhibition by contaminants, differential amplification, formation of artefactual PCR products, contaminating DNA, *rrn* operon heterogeneity) [33], or co-migration of bands from different phylotypes could also cause differences in band intensity. In our case, these differences were found again after repeating the whole protocol (from PCR to DGGE), suggesting that they do indeed reflect punctual differences in the relative abundances of species. Two samples, collected near the two tributaries of the lake, were characterized by large differences in the bands present or absent. These differences were greatest for the sample collected near the outlet of the major tributary (Leyse), which was also characterized by lower abundance. As previously described [34],



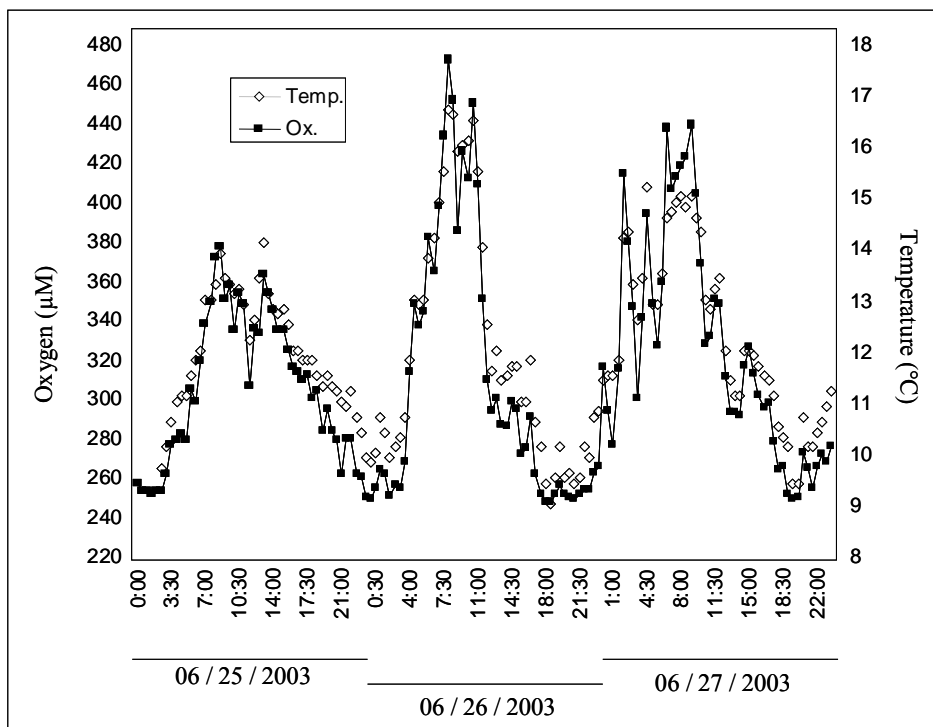
some bands were common to the typical lake pattern, whereas some new bands reflected river populations that had been not found in the rest of the lake. Recently, Lindström and Bergström [31] investigated the influence of inlet bacteria on the composition of bacterioplankton in two Swedish lakes characterized by different hydraulic retention times. They concluded that the input of allochthonous bacteria might be important, depending on the water discharged by the inlet and the retention time of the lake. In agreement with these authors it appears that in the Lac du Bourget, which is characterized by a long retention time (10 years) and also by a large water volume, the composition of the bacterioplankton community is very little influenced by the cells imported from tributaries.

Secondly, it appears that there were both horizontal and vertical differences in the abundance and species composition of the bacterioplankton community in the Lac du Bourget in June, when the water column was stratified. Variations in diversity were found mainly in the vertical scale. In contrast to the studies of Øvreås *et al.* [7] and of Dominik and Hofle [15], the number of bands increased with depth in Lac du Bourget, and concomitantly with a decrease in bacterial abundance. The greatest differences in bacterial abundance were found with regards to the depth. The study of Morris and Lewis [35] reported a similar decrease in bacterial abundances from the upper layer to the hypolimnion. Subsurface maximum bacterial abundance values of  $6.13E+06$  cells.mL<sup>-1</sup> in June, and a decline below the subsurface chlorophyll maximum parallel previous reports from other mesotrophic systems [36]. Physicochemical and biological factors are known to mediate the dynamics of bacterioplankton communities. Heterotrophic bacterioplankton appears to respond mostly to changes in the quantity and quality of the carbon source in terms of the disappearance/appearance of new species or rises or falls in the total cell number. One of the most important biotic variables affecting bacterial growth is the distribution of phytoplankton, because phytoplankton is the major source of labile bacterial substrates as a result of their production and exudation [37, 38].

In the epilimnic layer, there was no difference in the chemical parameters at 0 and 2 m depth (Fig. 8). Small but significant differences in the abundance of bacteria were recorded between the sampling points from the North of the lake to those from the South, whereas no differences in the DGGE band patterns were recorded. Other results showed that the epilimnion was homogeneous in terms of its organoleptic structure and phytoplanktonic species richness. At the same time, it was found that there were significant differences in the relative abundance of some species (cyanobacteria for example) along a North-South gradient [39]. These findings are consistent with the fact that DGGE patterns were homogeneous in

this layer, but also consistent with the fact that there was a significant difference in bacterial abundance with regard to the location of the sampling points (North *versus* South).

The greatest heterogeneity in DGGE band patterns was found in samples collected at a depth of 15 m, which may be related to the hydrodynamic processes (internal waves). More precisely, for the 15-m layer, there was no difference in bacterial cell counts at the scale of the lake, whereas there was a clearly-identified East-West gradient in the DGGE band patterns of samples located on the North-South transect. On the basis of internal waves, major differences were found on a day-to-day scale in the position of the thermocline in the water column. A difference of up to 8 m could be found in the depth of the thermocline, and thus in the position of the metalimnic layer, between the North and the South of the lake on the same day of sampling. This was highlighted by monitoring the oxygen concentrations at 13 m depth using an Optode sensor 3930 (Aanderaa, Bergen, Norway). Fig. 9 demonstrated clearly the existence of large internal waves within the Lac du Bourget at 26 June 2003 [39].



**Fig. 9.** Variations in the temperature (°C) and the oxygen concentration (µM) at 13 m depth in the Lac du Bourget from 25 to 27 June 2003. This figure demonstrates the presence of internal waves which might explain differences in the position of the metalimnic layer between distinct sampling points on the same day of sampling.

Finally, in the hypolimnic layer (30 and 50 m), there was no horizontal or vertical difference in the bacterial abundance at the scale of the lake, whereas the DGGE band patterns did depend on the depth of sampling. It is interesting to note that among the measured chemical parameters, the only one that differed at the 30- and 50-m depths, was the phosphorus content. As shown in Tab. 7, total phosphorus and phosphate displayed different concentrations at the depths of 30 and 50 m. Morris and Lewis [35] reported that phosphorus may be important in regulating bacterioplankton activity and biomass in aquatic systems. Other studies have highlighted the role of phosphorus in regulating phytoplankton and bacterioplankton growth in aquatic systems [40, 41].

The same kind of differences in community structures linked to the location within the water column seem to have been found by Dominik and Höfle in lake Plußsee [15] if we can judge from their 5S rRNA analysis. There were also different community structures in the epilimnion, the metalimnion and the hypolimnion. As suggested by Massana *et al.* [24], in aquatic systems, one of the most relevant gradients affecting the distribution of organisms within the water column is depth. Similarly, in the Lac du Bourget, when the lake is stratified, similarities in DGGE patterns are likely to be explained by the vertical proximity of two samples, as shown by the level of similarity (Cs). Summer similarity values indicate that assemblages are not subjected to dramatic changes between the surface and down to a depth of 50 m. When we compared the summer profiles to the “common” January profile, we were surprised to find high similarity values suggesting that there is a general composition that is probably maintained throughout the year. The change in season did not result in any marked shift in populations, and the community remained relatively stable. It should also be noticed that in the present study, the Sorensen value found between the common January profile and any June profile was higher than similarity between the epilimnion and hypolimnion profiles in June.

As also demonstrated in preliminary experimentations, no difference was recorded when comparing 0, 2, 30 and 50 m depth samples in summer filtered the first or the fourth day, meaning that this parameter does not constitute a bias in our analyses. For the 15 depth samples, differences were clearly linked to the geographical position in the lake and not to the date of filtering. Nevertheless, we have already seen to some extent, our view of the existing diversity is certainly limited and biased due to various pitfalls. The first factor that should be kept in mind, is that DGGE fingerprints reflect the microorganisms that are present at higher concentrations [30]. These authors report that the number of bands is related to the number of populations that account for more than 0.3 – 0.4% of the total cell counts. Thus, only

numerically dominant species are detected. Muyzer *et al.* [25] claim that the reported sensitivity of DGGE is 1% of the template DNA, so in theory the sensitivity of DGGE should not limit the ability to detect changes in community composition. The second type of pitfall consists of those which were listed above, and which may be introduced during sample collection, to insufficient or preferential disruption of cells during the DNA extraction step, or bias that may arise during the amplification or DGGE step (gel resolution, gel staining) [42].

Despite these pitfalls, if bands represent at least dominant populations, observed shifts in band pattern may be then ascribed to shifts in community composition [43]. Changes in diversity are likely to be related to hydrodynamic and biological parameters. In this way, changes may be due to changing trophic substrate availability, changing mortality caused by protozoan grazing and viral lysis, or changing physico-chemical conditions which favor different subpopulations relative to others, but also to the mixing of the water column. All these findings suggest that hydrodynamic, chemical and biological parameters can all influence the abundance and diversity of bacterioplankton assemblages in the Lac du Bourget.

In conclusion, our study revealed a great homogeneity in the composition and abundance of bacterial communities during winter holomixis, and the influence of water layers characterized by different physico-chemical and biological factors driving bacterioplankton community assemblages during the summer time, when the water column is stratified. In addition, internal waves have a great impact on the community composition of water sampled at 12-18 m depths. We suggest that the vertical profile of the temperature should be determined in order to sample within the layers of interest.

From a practical point of view, our findings suggest that only a small number of samples may be necessary to provide a reliable and representative estimation of the bacterial diversity of Lac du Bourget, as long as the samples are obtained from open and not isolated areas, and ones well away from freshwater inputs, which may affect the structure of the bacterioplankton communities of the lake. Our observations may facilitate future comparisons between great lakes, such as the lake Bourget, Lake Geneva and Lake Annecy, which are characterized by having different trophic levels and different phytoplanktonic communities.

**Acknowledgments:** We would like to thank the “Institut de Ciències del Mar”, in particular Carlos Pédro Alió, Laure Guillou and Vanessa Balague for giving Ursula Dorigo the possibility to get introduced to DGGE. Stéphan Jacquet is thanked for his introduction to flow cytometry. Gérard Paolini and Brigitte Le Berre are thanked for their assistance in water sampling and Mathieu Kopec, Manuela Fouqueray and Laurence Volatier for their help with the DGGE analyses. Data on the oxygen concentrations at 13 m depth were provided by Alexis Groleau (LGE, Université de Paris VII). Monika Ghosh is acknowledged for revising the English version of the manuscript. This work was partially funded by the Région Rhône-Alpes, Programme Emergence.

## REFERENCES

- [1] Morris, C.E., R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., and Giovannoni, S.J. (2002) Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 66, 592-616.
- [2] Loreau, M., Naeem, S., and Inchausti, P. (2002) Biodiversity and ecosystem functioning. Oxford University Press: New York, NY.
- [3] Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., and Ritz, K. (2002) *In situ* spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. *Microb. Ecol.* 44, 296-305.
- [4] Ranjard, L. and Richaume, A. (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152, 707-716.
- [5] Ranjard, L., Lejon, D. P. H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. and Chaussod, R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 5, 1111-1120.
- [6] Lindström, E.S. (1998) Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microb. Ecol.* 27, 163-174.
- [7] Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L. and Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3367-3373.

- [8] Brachvogel, T., Schweitzer, B., and Simon, M. (2001) Dynamics and bacterial colonization of microaggregates in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 23-35.
- [9] Knoll, S., Zwisler, W., and Simon, M. (2001) Bacterial colonization of early stages of limnetic diatom microaggregates. *Aquat. Microb. Ecol.* 25, 141-150.
- [10] Lindström, E.S. (2001) Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microb. Ecol.* 42, 598-605.
- [11] Bouvy, M., Pagano, M., and Troussellier, M. (2001) Effects of a cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) on bacteria and zooplankton communities in Ingazeira reservoir (northeast Brazil). *Aquat. Microb. Ecol.* 25, 215-227.
- [12] Gonzáles, J.M., Simó, R., Massana, R., Covert, J.S., Casamayor, E.O., Pedrós-Alió, C., and Moran, M.A (2000) Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing north atlantic algal bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4237.
- [13] van Hannen, E., Zwart, G., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J. and Laanbroek, H. J. (1999) Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 795.
- [14] Yannarell, A.C. and Triplett, E.W. (2004) Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 214-223.
- [15] Dominik, K. and Höfle, M.G. (2002) Changes in bacterioplankton community structure and activity with depth in a eutrophic lake as revealed by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3606-3613.
- [16] Humayoun, S.B., Bano, N., and Hollibaugh, J.T. (2003) Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda Lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1030-1042.
- [17] Murray, A.E., Preston, C. M., Massana, R., Blakis, A., Wu, K. and DeLong, E. F. (1998) Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2585-2595.
- [18] Palmer, F.E., Method, J.R., and Staley, J.T. (1976) Patchiness in the distribution of planktonic heterotrophic bacteria in lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 1003-1005.

- [19] Schauer, M., Massana, R., and Pedrós-Alió, C. (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microb. Ecol.* 33, 51-59.
- [20] Jacquet, S., Briand, J.F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J.C., Anneville, O., and 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.
- [21] Leboulanger, C., Dorigo, U., Jacquet, S., Le Berre, B., Paolini, G., and Humbert, J.-F. (2002) Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol.* 30, 83-89.
- [22] Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. and Vaultot, (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186-193.
- [23] Vaultot, D., Courties, C., and Partensky, F. (1989) A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry* 10, 629-635.
- [24] Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. and DeLong, E. F. (1997) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 50-56.
- [25] Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695.
- [26] Schauer, M., Balagué, V., Pedros-Alio, C. and Massana, R. 2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* 31, 163-174.
- [27] Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, D. and Olivier, J. M. (1997) Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* 7, 75-83.
- [28] Magurran, A.E. (1988) *Ecological diversity and its measurements*, 179 pp. Princeton University Press. Princeton N.J.
- [29] Murray, A.E., Hollibaugh, J.T., and Orrego, C. (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2676-2680.

- [30] Casamayor, E.O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Aliós, C. and Muyzer, G. (2000) Identification of spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 499-508.
- [31] Lindström, E.S. and Bergström, A.-K. (2004) Influence of inlet bacteria on bacterioplankton assemblage composition in lakes of different hydraulic retention time. *Limnol. Oceanogr.* 49, 125-136.
- [32] Farrelly, V., Rainey, F.A., and Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2798-2801.
- [33] Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625-630.
- [34] Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Ferry, H. and Suk-Kyun, H. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 141-155.
- [35] Morris, D.P. and Lewis, W.R. (1992) Nutrient limitation of bacterioplankton growth in Lake Dillon, Colorado. *Limnol. Oceanogr.* 37, 1179-1192.
- [36] Li, W.K.W. and Dickie, P.M. (2001) Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry* 44, 236-246.
- [37] Cole, J.J., Likens, G.E., and Strayer, D.L. (1982) Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 27, 1080-1090.
- [38] Sundh, I. (1989) Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. *J. Plankton Res.* 11, 463-486.
- [39] Freissinet, C., Cabal, A., Bertrand, O., Humbert, J.F., Jacquet, S., Groleau, A., Prevot, F., Sarazin, G., Tassin, B., and Vinçon-Leite, B. (2004) Sacytox. Prototype de système d'alerte pour les proliférations de cyanobactéries toxiques dans les lacs: diagnostic et prévision. Ministère de l'Ecologie et du Développement durable, réseau riteau. 193 pp.
- [40] Sala, M.M., Peters, F., Gasol, J. M., Pedrós-Aliós, C., Marrasé, C. and Vaqué, D. (2002) Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 47-56.



- [41] Scanlan, D.J. and Wilson, W.H. (1999) Application of molecular techniques to addressing the role of P as a key effector in marine ecosystems. *Hydrobiol.* 401, 149-175.
- [42] Wintzingerode, F.V., Goebel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microb. Rev.* 21, 213-229.
- [43] Ward, D.M., Ferris, M. J., Nold, S. C. and Bateson, M. M. (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62, 1353-1370.

## **2. Article n° III : Comparative study on the composition of the freshwater eubacterioplankton community in three deep French Alpine lakes of different trophic status.**

### **2.1. Contexte de l'étude**

Le but de ce travail était de 1) constituer un inventaire des espèces eubactériennes présentes dans les trois grands lacs Alpains français que sont Annecy, le Bourget et le Léman et 2) rechercher les facteurs structurant la composition eubactérienne dans ces écosystèmes. L'intérêt de cette comparaison est que ces trois lacs se distinguent surtout par des statuts trophiques différents (consulter Chapitre II).

### **2.2. L'étude réalisée**

Nous avons réalisé des prélèvements en 2003 dans chacun de ces lacs au niveau de leur point de référence d'échantillonnage (se référer au Chapitre II) à deux profondeurs (2 et 50 m). Cet échantillonnage a été répété à trois dates, en hiver, au printemps et en été. L'analyse de la composition eubactérienne a été menée sur la fraction d'eau comprise entre 0,2  $\mu\text{m}$  et 2  $\mu\text{m}$  et elle est basée sur l'étude d'une partie du gène codant pour une fraction 16S de l'ARN ribosomal à l'aide de deux approches : le clonage-séquençage et la DGGE. En ce qui concerne le clonage-séquençage, 18 banques de clones ont ainsi été réalisées et 30 clones par banque ont été séquencés.

### **2.3. Quelles sont les grands groupes taxonomiques ?**

Nous avons obtenu au total 509 séquences, parmi lesquelles nous avons conservé 480 séquences eubactériennes. 51% de ces séquences appartenaient aux *Actinobactéries*, 16% aux  *$\alpha$ -Protéobactéries*, 16% aux  *$\beta$ -Protéobactéries*, 5% au groupe des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* et 3% aux groupes des  *$\gamma$ -Protéobactéries*. Le faible pourcentage de séquences restantes, se rapporte à des séquences inconnues, mais aussi à des séquences appartenant aux *Firmicutes* ou aux cyanobactéries. Au total, nous avons pu définir 60 OTUs (la similitude des séquences au sein d'un OTU étant  $> 95\%$ ). Malgré le nombre total important de clones séquencés (30 par banque de clones), celui-ci s'est avéré nettement insuffisant pour travailler à des niveaux taxonomiques plus fins, comme les analyses de raréfaction l'ont démontré.

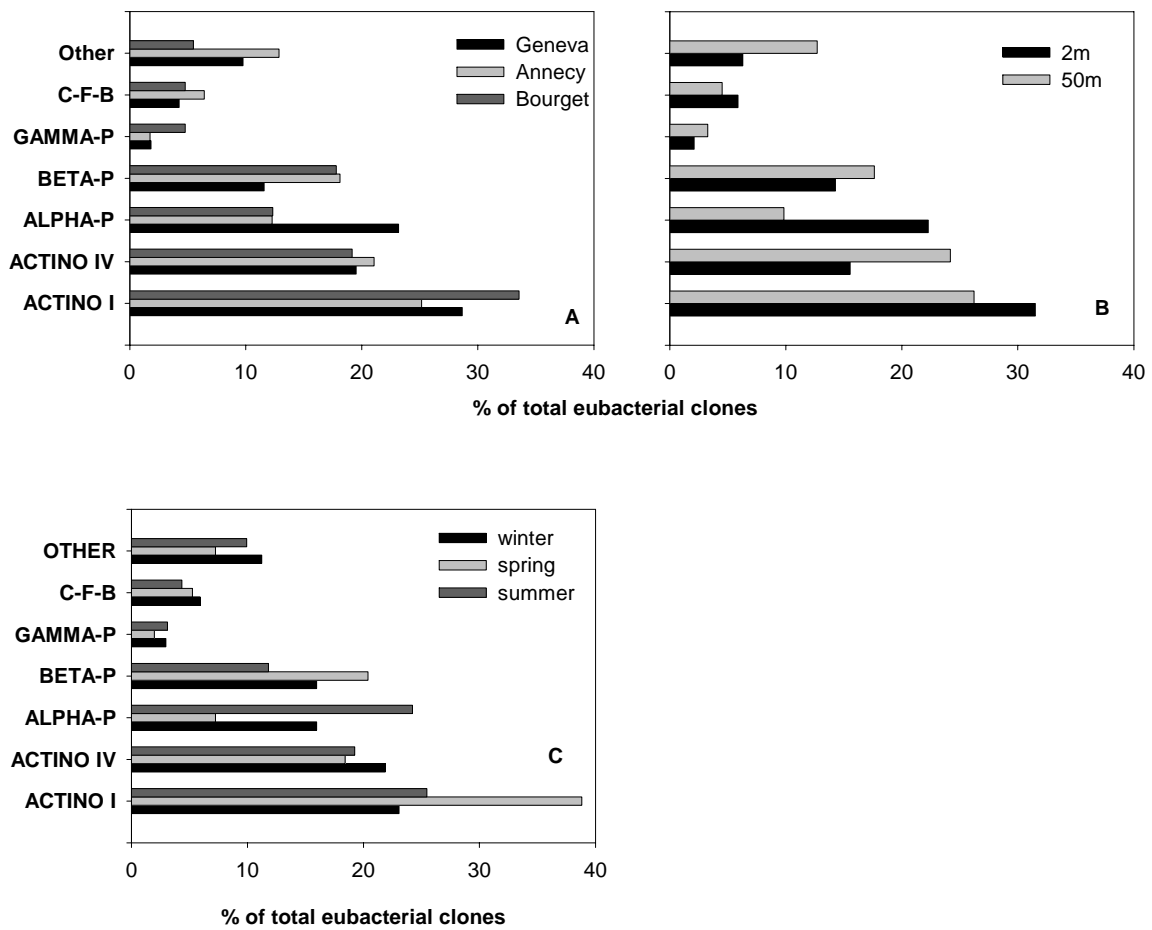
## 2.4. Homologie et origine des séquences trouvées

La comparaison de nos séquences avec celles figurant dans la banque de séquences nucléotidiques relatives à l'ARN 16S (la banque NCBI : National Center for Biotechnology), nous a renseigné sur leur origine et sur leurs homologies avec les séquences obtenues dans d'autres écosystèmes.

Il apparaît tout d'abord que peu de séquences ont une identité forte avec des espèces cultivées. En effet, parmi les 60 OTUs, seules 12 d'entre elles ne regroupant que 25% des séquences, montrent une forte homologie (> 95%) avec des espèces cultivées. 6 OTUs parmi les 60 peuvent être considérées comme étant des genres, nouveaux, en raison de leur faible homologie avec des espèces cultivées mais aussi avec des espèces non cultivées.

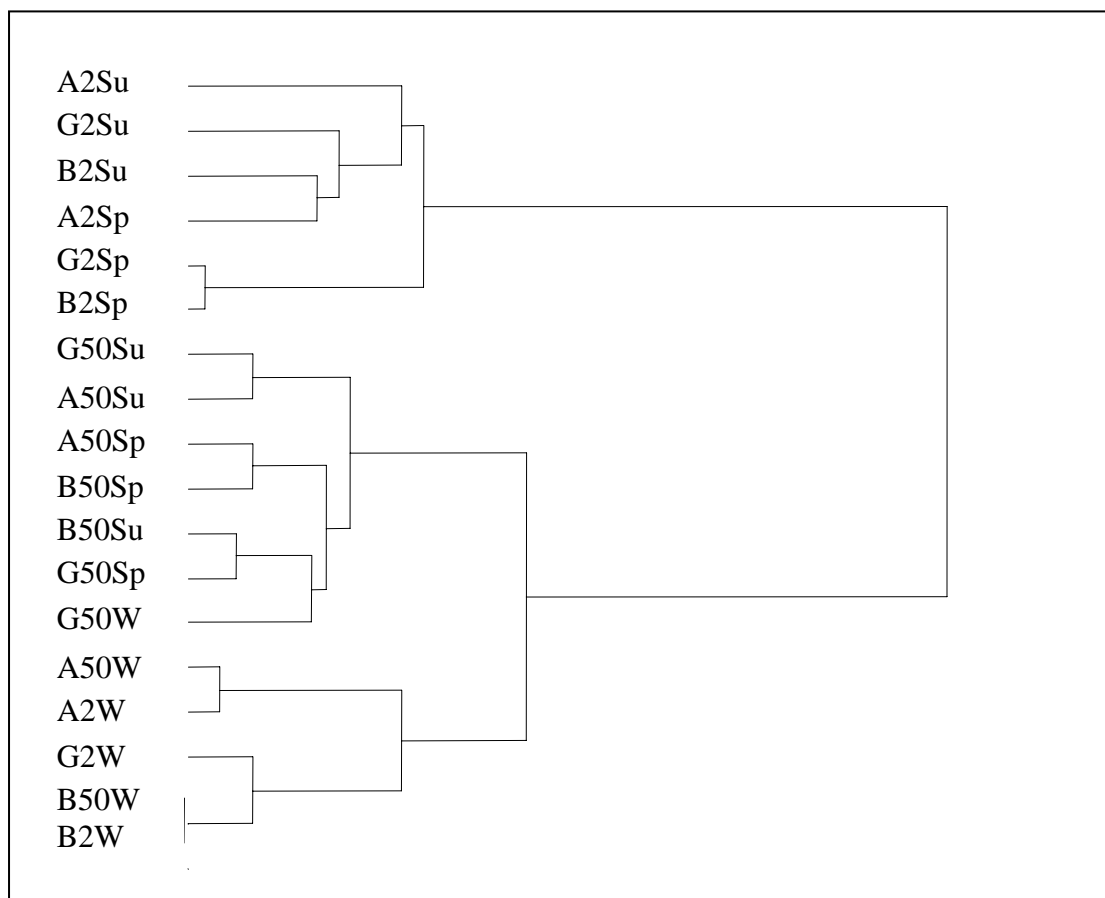
Il apparaît ensuite que la majorité des séquences partage une forte identité avec des séquences d'eau douce ce qui traduit une faible influence des communautés allochtones terrestres par exemple. Plus de 85% des séquences montrent même une forte homologie avec des séquences issues de prélèvements réalisés en eau douce, et notamment dans d'autres systèmes lacustres.

Il existe des différences dans la composition des communautés eubactériennes de ces lacs en fonction de la saison et de la profondeur du prélèvement, mais pas du lac d'origine (Fig. 18A, B, C). Si les *Actinobactéries* sont toujours dominantes, suivies par les *Protéobactéries*, il apparaît cependant des différences concernant les premières qui sont globalement plus abondantes à 50 m qu'à 2 m, et les secondes qui sont globalement moins abondantes à 50 m qu'à 2 m et également moins abondantes au printemps qu'en été ou en hiver.



**Fig. 18A, B, C.** Les proportions relatives des séquences eubactériennes appartenant au groupe I et IV des Actinobactéries (ACTINO I et IV), aux  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -Protéobactéries (ALPHA-, BETA- et GAMMA-P), C-F-B et à d'autres groupes mineures, fonction du lac d'origine (A), de la profondeur (B) et de la saison (C).

L'analyse du gel de DGGE (Fig. 19) montre également une influence saisonnière, et dans une moindre mesure une influence de la profondeur, sur la composition des communautés bactériennes. L'origine géographique des prélèvements semble une nouvelle fois peu discriminante.



**Fig.19.** Analyse de « cluster » de la similarité des profils de DGGE à différentes saisons (W: hiver, Sp: printemps, Su: été) et à 2 et 50 m pour les lacs d'Annecy (A), du Bourget (B) et le Léman (G).

L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'en dépit d'états trophiques différents, les lacs Alpains hébergent des communautés bactériennes pélagiques très similaires dans leur composition. Il est probable que la forte ressemblance entre les communautés eubactériennes de ces trois lacs, soit due au grand volume de ces lacs (l'hypolimnion) qui se caractérise par de nombreux paramètres communs aux trois lacs et au partage de nombreux processus et facteurs environnementaux, tels que le climat, le pH, l'alcalinité, etc. Nous avons cependant constaté que, ponctuellement dans le temps, des différences importantes pouvaient être observées au niveau de l'épilimnion lorsque la matière organique conséquence du développement du phytoplancton est présente en grande quantité.

Pour conclure, ces travaux ont donc permis de montrer que des contraintes environnementales partagées se situant donc à un niveau d'influence régional, structurait de façon forte la composition des communautés eubactériennes des trois grands lacs Alpains français. Les pressions sélectives locales et notamment la quantité et la qualité de la matière organique disponible, ne semble agir que ponctuellement dans l'espace et dans le temps sur ces communautés.



## **Comparative study on the composition of the freshwater eubacterioplankton community in three deep French Alpine lakes of different trophic status**

U. Dorigo<sup>1</sup>, D. Fontvieille<sup>1</sup> & J.F. Humbert<sup>1,2\*</sup>

1. INRA-Université de Savoie, UMR CARRETEL, BP 511, 74203 Thonon Cedex, France

2. Institut Pasteur, Unité des Cyanobactéries, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

*Running title:* Alpine lake eubacterioplankton community composition

**Summary:** We compared the composition of the eubacterioplankton communities in three neighboring, deep, sub-Alpine lakes (Annecy, Bourget and Geneva), with contrasting trophic levels (ranging from oligotrophic to meso-eutrophic). BLAST analysis of the 480 sequences recovered, showed that most of them have highest identity with sequences from other freshwater clone libraries than with terrestrial ones. This suggests that there is little interaction between communities originating from different ecosystems (terrestrial *versus* aquatic, for example). Among our sequences, 51% belonged to *Actinobacteria*, 16% to *Alphaproteobacteria*, 16% to *Betaproteobacteria*, 5% to *Bacteroidetes* and 3% to *Gammaproteobacteria*. At this taxonomic resolution level, no significant difference was found in the global composition of the bacterioplankton communities of the three lakes. In addition, it appears that most of the main operational taxonomic units defined at the species or the genus levels, were distributed in all these lakes. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the same 16S rRNA gene fragment also suggests a lack of major differentiation in their bacterioplankton community composition. Finally, these findings seem to show that shared environmental selective pressures have more influence on the global composition of the eubacterioplankton community than local selective pressures, such as nutrient and chlorophyll *a* concentrations. However, the influence of these two latter parameters was detected temporarily in spring and summer in the epilimnic layer, when the phytoplanktonic biomass was higher in the two meso-eutrophic lakes (Bourget and Geneva).



## Introduction

More than a billion of bacterial species are thought to exist on Earth, but to date less than 1% of these species have been described, mainly because only a small number of bacteria can be cultured (19). For freshwater bacteria for example, Jones (44) estimated that only 0.25% of species can be grown in culture. However, new culture strategies (4, 10, 46, 77, 90), and the development of molecular tools mainly based on the study of the 16S rRNA gene, have revolutionized the situation, and considerably increased our knowledge about the diversity of bacteria in many ecosystems (3, 40, 62, 67, 82, 86). Since the study of Giovannoni *et al.* (25), who applied rRNA gene-based cloning and sequencing techniques to the study of natural microbial diversity, the number of sequences in public databases has risen steadily, and technologies for retrieving them have been routine since 1996 (65). In 1987, Woese described 12 bacterial phyla on the basis of 16S rRNA (86). This number subsequently increased to 36 phyla (40, 41), one third of which were candidate phyla, *i.e.* of which there were no cultured representatives (they are known only from environmental gene clone sequences). Finally, Rappé and Giovannoni (65) described 52 phyla, 26 of which were candidate phyla. However, despite increasing numbers of papers, fewer sequence data are still available about some ecosystems, such as lakes and ponds, than about those in marine or soil habitats, which are more often investigated. Large species inventories in freshwater ecosystems are required to get a better estimation of the eubacterial diversity, but also to identify the factors and the processes driving this diversity.

By assuming a log-normal species abundance curve, which is characteristic of rapid and randomly-growing microorganisms, such as bacteria, diversity has been shown to be related to the total number of individuals in a community and to the abundance of the most abundant members in this community (14). A positive relationship between the number of species in an area, and the size of this area has been reported by Horner-Devine *et al.* (38), but we are only beginning to understand the patterns of distribution of bacterial biodiversity, and the influence of habitat type and heterogeneity on these patterns (37). Many environmental variables, such as land use or nutrient concentrations, are involved, and it will be very difficult to distinguish their relative influences. It will be also very difficult to determine the contribution of local effects and global changes respectively on the biodiversity. The relationships between allopatric communities (aquatic and terrestrial, for example) located in the same geographical area (e.g. a catchment area), and between species pools at local and regional scales also need to be investigated further. Concerning the first point, allochthonous bacteria from the inlets, may affect the lake bacterioplankton community composition (BCC)

(49, 52), but also that of bacteria from the drainage area, the littoral zone and the lake sediments. With regard to the second point, a recent study by Witman *et al.* (85) has shown that the regional species pool had a major impact on the local species richness of marine benthic communities.

Finally, all these questions can also be viewed in the context of the wider debate recently initiated by Finlay *et al.* (22) concerning the lack of geographical differentiation in microbial communities due to their small size, their metabolic plasticity and their incredible abundance, all of which promote high rates of dispersal. However, at the species level, studies of various eubacterial (e.g. Cho and Tiedje (7) on the *Pseudomonas* genus; Gugger *et al.* (29) on the *Cylindrospermopsis* genus) and archaean (e.g. Whitaker *et al.* (84) on the *Sulfolobus* genus) models have clearly demonstrated that these populations do exhibit biogeographic structures. Yannarell *et al.* (89) recently found, using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), that at the community level, the differentiation in the diversity of eubacterial communities for a suite of 30 lakes extending from northern and southern Wisconsin followed a latitudinal pattern. So, it will be very interesting to determine the respective influences of local, regional and global environmental selective pressures on the composition of microbial communities, and to identify any latitudinal or longitudinal biogeographic differentiation.

To try and answer some of these questions, we first carried out an inventory and a comparison of the composition of the eubacterial community in three neighboring, deep, Alpine lakes, which are characterized by their nutrient status ranging from oligotrophic to mesotrophic. The BCC in these lakes was evaluated in 2003 during three different seasons (Winter, Spring and Summer), and at two depths (2 and 50 m), corresponding to the epilimnic and metalimnic layers during the stratification period (from late spring to autumn). Two molecular methods were used, both primarily based on the PCR amplification of a 550 bp fragment of the 16S rRNA gene: Denaturant Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and random sequencing in clone libraries.

## Materials and Methods

**Study sites and sampling strategy.** Water samples were collected in three sub-Alpine lakes, which differed mainly with regard to their trophic parameters and the presence or absence of toxic cyanobacteria proliferations. Lake Annecy (depth max: 45 m; location: 45°54'N, 06°07'E) is oligotrophic, whereas Lake Bourget (140 m; 45°48'N, 05°49'E) and Lake Geneva (311m; 46°22'N, E06°28'E) are both mesotrophic. Proliferations of *Planktothrix rubescens*

occur mainly in Lake Bourget (43), and occasionally in Lake Geneva. Additional details about different physico-chemical and biological parameters are given in Table 1. Sampling was carried out on three separate occasions in 2003: during the winter stratification period (January), in spring (April-May), when the water mass had begun to stratify, and in summer (August) when the water column was completely stratified. Lake Annecy was sampled on January 21, May 6 and August 12, Lake Bourget on January 14, April 23, and August 5, and finally Lake Geneva on January 21, April 28 and August 4. Samples were collected from each lake at a specific sampling station located above the deepest spot in the lake. At each sampling station, and at each sampling date, water samples from the surface (~2 m) and from deeper water (~40-50 m) were collected, and put into previously autoclaved plastic bottles that were rinsed with water from each sample. Each time, 500 mL was taken and kept in the dark at 4°C until being processed immediately on arrival in the laboratory (3 hours later).

**Table 1.** Selected physico-chemical, morphometric and biological parameters for lakes Annecy, Bourget and Geneva. Ranges are for across the entire year between 0 and 50 m in depth and were obtained by sampling twice a month at a given reference station within each lake, corresponding to its greatest depth.

|  | <b>Lake Annecy</b> | <b>Lake Bourget</b>  | <b>Lake Geneva</b> |
|--|--------------------|----------------------|--------------------|
| Volume (km <sup>3</sup> )                  | 1.1                | 3.5                  | 89                 |
| Surface area (km <sup>2</sup> )            | 28                 | 45                   | 585                |
| Max/mean depth (m)                         | 65/41.5            | 145/81               | 310/172            |
| Landscape position, altitude (m)           | 447                | 232                  | 372                |
| Water residence time (years)               | 3.8                | 10                   | 11                 |
| Trophic state                              | oligotrophic       | mesotrophic          | mesotrophic        |
| Proliferation of <i>P. rubescens</i>       | absent             | Regularly since 1997 | Rarely             |
| Mixing type                                | monomictic         | mono/meromictic      | meromictic         |
| Total phosphorus (mgP.L <sup>-1</sup> )    | 0.002-0.01         | 0.005-0.05           | 0.008-0.037        |
| Total nitrogen (mgN.L <sup>-1</sup> )      | 0.11-0.72          | 0.10-1.16            | 0.13-0.92          |
| pH   | 7.61-8.49          | 7.57-8.72            | 7.53-8.73          |
| Chlorophyll <i>a</i> (µg/L)                | 0.09-1.78          | 0.1-19.27            | 0.03-18.21         |
| Temperature (°C)                           | 5.03-25.03         | 5.80-26.19           | 5.80-26.69         |
| Dissolved oxygen (mg.L <sup>-1</sup> )     | 6.66-14.98         | 5.20-14.74           | 5.66-16.52         |
| Total organic carbon (mg.L <sup>-1</sup> ) | 1.27-2.68          | 1.52-2.65            | 0.74-2.17          |
| Secchi depth (m) (water clarity)           | 3.7-10             | 2.5-9.6              | 2.5-14             |

1 **Collection of environmental data.** At each sampling station and date, the vertical profiles of  
2 temperature, depth, pH, dissolved oxygen and chl *a* were obtained by the mean of  
3 conductivity-temperature-depth devices (in Annecy and Geneva: CTP 90, Sea and Sun  
4 Technology; in Bourget: CTD Seabird SBE 19 Seacat profiler and a BBE Fluoroprobe). In  
5 Lake Bourget, the Fluoroprobe allowed us to estimate not only the chl *a* content, but also that  
6 of other pigments in order to assess the main algal classes and make it easy to identify *P.*  
7 *rubescens* blooms (48). Chemical analyses (total organic carbon, total nitrogen, total  
8 phosphorus) were done as soon as the samples reached the laboratory, and were carried out in  
9 accordance with standard French procedures and protocols (1).

10  
11 **Sample processing in the laboratory.** 250 mL of each lake-water sample was immediately  
12 vacuum-filtered through a 2 µm pore-size polycarbonate membrane prefilter (Nucleopore) to  
13 eliminate larger eukaryotes (phytoplankton and zooplankton, the chloroplastial or  
14 mitochondrial 16S rRNA gene of which would be amplified by the PCR primers used). This  
15 pre-filtration step also excluded filamentous and particle-associated bacteria. Microbial  
16 biomass < 2 µm was then collected and trapped on 0.2 µm pore-size polycarbonate membrane  
17 filters (Nucleopore). The filters were stored at -80°C for subsequent diversity analyses by both  
18 cloning-sequencing and DGGE. Moreover, 1 mL of the < 2 µm fraction was preserved with  
19 glutaraldehyde at a final concentration of 1%, and stored at 4°C for no more than 1 day until a  
20 bacterial count could be done using flow cytometry.

21  
22 **FCM analyses.** Heterotrophic bacterial counts were done using a FACSCalibur (Becton  
23 Dickinson) flow cytometer equipped with a blue laser beam fixed at 488 nm using the same  
24 protocol as described in Dorigo *et al.* (16).

25  
26 **DNA extraction.** Nucleic acid extraction was performed on the 0.2 µm filters and as  
27 described in Massana *et al.* (54) with minor modifications. Each of the 0.2 µm filters was  
28 placed in an Eppendorf microtube, to which 750 µl of lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM  
29 Tris-HCl, 0.75 M sucrose) pre-warmed to 55°C had been added. The filters were re-frozen at  
30 -80°C, and then thawed by putting the tubes into a water bath at 55°C for 2 min, vortexed and  
31 placed in a sonication bath for 2 min. Lysozyme (Eurobio, 20,000 U/mg, 2.4 mg.mL<sup>-1</sup> final  
32 concentration) was then added to the filters, and filters were incubated at 37°C for 45 min at  
33 slight movement. Subsequently, SDS (sodium dodecyl sulfate, 1% final concentration) and  
34 proteinase K (Eurobio, 30 mU/mg, 0.2 mg.mL<sup>-1</sup> final concentration) were added, and the

1 filters were incubated at 55°C for at least 90 min. The lysates were transferred to a fresh  
2 Eppendorf tube, and purified twice by phenol-chloroform-isoamyl alcohol. The integrity of  
3 the total DNA was checked by agarose gel electrophoresis, and quantified from the  
4 absorbance at 260 nm. The DNA was stored at 20°C until analyzed.

5  
6 **PCR amplification and cloning.** PCR amplifications were performed in 50- $\mu$ l volumes  
7 containing approximately 30-60 ng of extracted DNA, a 10X *Taq* reaction buffer (Eurobio),  
8 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 120  $\mu$ M of each deoxynucleotide, 1  $\mu$ M of each primer targeting the 16S  
9 rDNA gene corresponding to positions 358-907 of the *Escherichia coli* 16S rRNA, bovine  
10 serum albumin (Sigma, 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> final concentration), and 1.25 U *Taq* DNA polymerase  
11 (*Eurobluetaq*, Eurobio). The primer combination of Eubacterial-specific primer 358f (60) and  
12 universal primer 907rM (70) yielded a DNA fragment of *ca.* 550-bp. For each set of reactions,  
13 a negative control, in which the template was replaced by an equivalent volume of sterile  
14 deionized water, was included. PCR reactions were carried out as described in Schauer *et al.*  
15 (69).

16 Amplification products were cloned into the vector pGEM T Easy (Promega) according to the  
17 Manufacturer's instructions. Positive transformants were randomly selected from each of the  
18 18 clone libraries (3 lakes x 2 depths x 3 seasons). 30 clones per sample (per clone library) ,  
19 *i.e.* a total of 540 clones were both sp6 and t7 sequenced on an Applied Biosystems 373  
20 automated sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA), according to the Supplier's  
21 instructions.

22  
23 **Phylogenetic analysis and phylogenetic trees.** The partial 16S rRNA gene sequences  
24 recovered from the clone libraries were aligned and edited using GeneDoc (61). Sequences  
25 identified as chimeric sequences by Bellerophon, freely available at  
26 <http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl> (39), and by the Chimera Check software  
27 program of the Ribosomal Database Project II (RDPII, freely available at  
28 <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>. (8), were eliminated from the alignment. The remaining  
29 sequences were identified by searching for homologous sequences both at the RDPII using  
30 the Sequence Match and the Classifier tools and at the National Center for Biotechnology  
31 Information (NCBI, freely available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) by use of the BLAST  
32 (Basic Local Alignment Search Tool) network service (2). Analysis of the whole data set was  
33 performed by constructing a phylogenetic tree for the whole data set by Neighbor-Joining  
34 (NJ) (68) on Jukes-Cantor distances (45) using the PHYLIP Software Package (21). The

1 bootstrap option was used to run 500 replicates. The tree was drawn using TreeView (63), and  
2 several main clusters and subclusters were defined on the basis of their bootstrap proportion.  
3 All trees are presented as supplemental material. Intra-subcluster similarities were calculated  
4 with Genedoc from an alignment truncated to the shortest sequence within each cluster. All  
5 subclusters (except three of them) were defined as Operational Taxonomic Units (OTUs),  
6 using a taxon resolution of at least 95% sequence similarity. The justification for the choice of  
7 this 95% cut-off for the definition of the different OTUs, was based on the fact that all OTUs  
8 were then well supported by their bootstrap value (>90%) when submitted to resampling. On  
9 the other hand, with a cut-off >95%, a significant proportion of these OTUs was generally not  
10 supported by their bootstrap values, which does not allow a clear identification of them.  
11 Despite this 95% cut-off, intra-OTU sequence similarities were generally >98% (Table 3),  
12 meaning that these OTUs probably correspond to different species. For the other cases (intra-  
13 OTU sequence similarities <98%), we assume that the OTUs correspond to different genera.  
14 Finally, for the *Actinobacteria* phylum, the cluster labels used correspond to those defined by  
15 Eiler and Bertilsson (20).

16

17 **Statistical analyses of the clone data set.** The number of sequences belonging to the  
18 different OTUs was used to carry out a rarefaction analysis of each clone library set with the  
19 PAST software package (33), freely available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>. All the  
20 Ancecy, Geneva and Bourget data were pooled to construct a binary table based on the  
21 presence/absence of different OTUs to assess the degrees of Sørensen's pairwise similarity  
22 between the three lakes (53, 59). The EstimateS software program (9) was used for estimating  
23 the richness (Chao1, Shannon index). Coverage was calculated as described in the paper of  
24 Eiler and Bertilsson (20).

25

26 **Nucleotide sequence accession numbers.** 16S rRNA gene sequences in this study have been  
27 added to the GeneBank™ database under accession number n° AJ965761 to AJ 966243.

28

29 **Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).** PCR amplifications were performed as  
30 described above, apart from using a modified version of the eubacterial-specific primer, 358f-  
31 GC (60). DGGE analysis was then performed on *ca.* 600-bp amplified DNA fragments (550  
32 bp plus the GC-rich fragment needed for the DGGE analyses), essentially as described in  
33 Schauer *et al.* (70), using the CBS-DGGE 2000 system (C.B.S. Scientific, company, INC.).  
34 The same protocol as described in Dorigo *et al.* (16) was used for the electrophoresis except

1 for the linear gradient of the denaturants urea and formamide, increasing from 40% at the top  
2 of the gel to 80% at the bottom. The gel image was digitalized using a Kodak DC290 camera.

#### 4 **DGGE data analyses**

5 DGGE banding patterns were converted to a binary table by using GeneTools software  
6 (SynGene, Cambridge, England) to make it easier to compare the samples. A table was  
7 constructed (with samples as rows and DGGE bands as columns) on the basis of the presence  
8 or absence of a nucleic acid band at a given height in each lane (scored as 1 or 0,  
9 respectively). A cluster analysis computing hierarchy based on the Ward method was then  
10 performed, using the ADE-4 Software Package (79). All the Annecy, Geneva and Bourget  
11 data in this table were pooled to assess the degrees of Sørensen's pairwise similarity between  
12 the three lakes. This was done as described above, but by considering bands instead of OTUs.

#### 14 **Results**

15 **Limnological data and FCM counts.** As seen in Table 2 the temperature values ranged from  
16 6 and 25°C in all the lakes. Temperature profiles indicated that the water column was well  
17 mixed in winter, and stratified in spring and in summer. The pH values ranged between 7.65  
18 and 8.62, indicating that the Annecy, Bourget and Geneva lakes can be classified as slightly  
19 alkaline lakes. Correspondence analysis of the data reported in Table 2 suggests that season  
20 and depth strongly influenced the values, and that there was less variation in Lake Annecy  
21 than in the other two lakes (data not shown).

22 Total bacterial abundances ranged between  $1.11 \times 10^6$  and  $7.44 \times 10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>.  
23 During the winter mixing period similar numbers were found at 2 and 50 m depth in every  
24 lake, whereas during the stratification period (spring and summer) densities were higher in the  
25 epilimnic layer (2 m) than in the hypolimnic layer (50 m), except for the Annecy sample in  
26 spring. Once again, the data from Lake Annecy were less dispersed than those from the two  
27 other lakes. Indeed, the abundance of bacteria in lakes Bourget and Geneva displayed a  
28 pronounced seasonal variation in their densities, with a clear summer peak in the epilimnion.  
29 No obvious seasonal trend was observed in the variations of bacterial abundances in the  
30 hypolimnic layer of lakes Bourget and Geneva.

1 **Table 2.** Physico-chemical and biological data (T, temperature; Chl *a*, chlorophyll *a*, DO, dissolved oxygen; BD, bacterial densities; TOC, total  
 2 organic carbon), and analysis of the 16S rRNA diversity (Number of sequenced clones and of detected OTUs, Chao1 estimator, Shannon index,  
 3 coverage analysis) for each sampling date and site. W: winter, Sp: spring, Su: summer

| Lake    | Date | Depth<br>(m) | T<br>(°C) | Chl <i>a</i><br>(µg/L) | pH  | DO<br>(mg/L) | BD<br>(cells/mL) | Ptot<br>(mg/L) | Ntot<br>(mg/L) | TOC<br>(mg/L) | <i>Planktothrix<br/>rubescens</i><br>(µg/L) | Number<br>of clones<br>analyzed | Detected<br>OTUs | Shannon<br>index | Chao1<br>estimate<br>(± S.D.) | Coverage |
|---------|------|--------------|-----------|------------------------|-----|--------------|------------------|----------------|----------------|---------------|---|---------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|----------|
| Annecy  | Wi   | 2m           | 6.1       | 0.84                   | 7.9 | 9.4          | 2.08E+06         | 0.004          | 0.4            | 1.6           | n.a.  | 30                              | 14               | 2.5              | 21(6.4)                       | 67%      |
|         |      | 50m          | 6.0       | 0.67                   | 7.9 | 8.6          | 2.17E+06         | 0.004          | 0.4            | 1.7           | n.a.  | 28                              | 14               | 2.44             | 28 (11.5)                     | 50%      |
|         | Sp   | 2m           | 16.2      | 1.61                   | 8.4 | 10.6         | 1.79E+06         | 0.006          | 0.4            | 1.7           | n.a.  | 30                              | 12               | 2.2              | 33 (17.3)                     | 36%      |
|         |      | 50m          | 5.7       | 0.50                   | 8.0 | 10.0         | 2.92E+06         | 0.004          | 0.3            | 1.7           | n.a.  | 28                              | 12               | 2.3              | 14 (5.3)                      | 86%      |
|         | Su   | 2m           | 25.0      | 0.51                   | 8.2 | 8.3          | 1.55E+06         | 0.006          | 0.4            | 2.1           | n.a.  | 30                              | 12               | 2.1              | 22.5 (9.4)                    | 53%      |
|         |      | 50m          | 5.9       | 0.16                   | 7.7 | 6.7          | 1.74E+06         | 0.003          | 0.3            | 1.7           | n.a.  | 26                              | 15               | 2.7              | 22 (5)                        | 68%      |
| Bourget | Wi   | 2m           | 6.8       | 2.89                   | 8.0 | 10.4         | 1.72E+06         | 0.020          | 0.6            | 1.9           | 2.8   | 27                              | 15               | 2.6              | 18.5 (3.5)                    | 81%      |
|         |      | 50m          | 6.8       | 3.62                   | 8.0 | 10.4         | 1.71E+06         | 0.019          | 0.6            | 1.9           | 3.6   | 28                              | 13               | 2.4              | 14.7 (2.1)                    | 88%      |
|         | Sp   | 2m           | 11.6      | 9.44                   | 8.4 | 13.5         | 3.41E+06         | 0.040          | 0.6            | 2.3           | 0.6   | 24                              | 13               | 2.3              | 31 (13.8)                     | 42%      |
|         |      | 50m          | 6.2       | 0.68                   | 7.9 | 10.0         | 1.42E+06         | 0.029          | 0.9            | 1.7           | 0.4   | 19                              | 11               | 2.2              | 16.3 (4.9)                    | 67%      |
|         | Su   | 2m           | 25.7      | 0.24                   | 8.4 | 11.7         | 4.71E+06         | 0.007          | 0.2            | 2.4           | 0.2   | 24                              | 11               | 2.2              | 13.5 (3)                      | 82%      |
|         |      | 50m          | 6.2       | 0.27                   | 7.7 | 9.6          | 2.48E+06         | 0.007          | 0.5            | 2.2           | 0.2   | 24                              | 12               | 2.3              | 22.5 (9.4)                    | 53%      |
| Geneva  | Wi   | 2m           | 6.9       | 0.89                   | 8.0 | 10.3         | 1.32E+06         | 0.019          | 0.5            | 1.0           | n.a.  | 25                              | 13               | 2.1              | 35.5 (16.4)                   | 37%      |
|         |      | 50m          | 6.8       | 0.67                   | 8.0 | 9.4          | 1.18E+06         | 0.026          | 0.6            | 1.0           | n.a.  | 30                              | 16               | 2.6              | 23 (3)                        | 70%      |
|         | Sp   | 2m           | 12.5      | 8.47                   | 8.6 | 13.2         | 4.09E+06         | 0.035          | 0.7            | 1.8           | n.a.  | 20                              | 10               | 2.1              | 12.5 (6)                      | 57%      |
|         |      | 50m          | 6.4       | 0.46                   | 7.9 | 10.4         | 1.11E+06         | 0.025          | 0.9            | 0.9           | n.a.  | 30                              | 13               | 2.4              | 18 (5.1)                      | 72%      |
|         | Su   | 2m           | 23.7      | 0.96                   | 8.6 | 10.3         | 7.44E+06         | 0.011          | 0.2            | 2.0           | n.a.  | 29                              | 10               | 1.7              | 17.5 (7.4)                    | 57%      |
|         |      | 50m          | 6.5       | 0.19                   | 7.7 | 9.2          | 1.57E+06         | 0.027          | 0.7            | 1.0           | n.a.  | 28                              | 15               | 2.5              | 19.7 (4.2)                    | 76%      |



**Clone library analyses.** Thirty positive clones were randomly selected within each of the 18 clone libraries. We obtained 509 exploitable sequences (an average of 28 sequences per clone library) which were further analyzed. Twenty-two sequences were identified as likely to be chimeric sequences, three as plastidial sequences and four sequences displayed less than 75 % identity with eubacterial sequences and were eliminated from further analyses.

The NJ tree of the 480 remaining sequences revealed three main clusters, which were strongly supported by their bootstrap proportions. The first cluster consisted of 245 *Actinobacteria* sequences, the second of 165 *Proteobacteria* sequences and the third of 24 *Bacteroidetes* sequences; 46 sequences did not match any of these big clusters, and were analyzed separately. 71 OTUs were defined within each of these clusters and were validated by having high bootstrap values (from 90-100%) and high sequence similarities (> 95%). Among these 71 OTUs, 23 were singletons (representing only 1 sequence), whereas seven OTUs were represented by at least 10 sequences. The consensus sequence of each OTU was used to search for homologous sequences within the NCBI database (Table 3), including some of those in our alignment.

Details about the clusters corresponding to *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and “others” are given in the next few paragraphs.

**(i) *Actinobacteria* 16S rRNA gene sequences.** Analysis of all *Actinobacteria* sequences revealed two main groups, which were named in agreement with the cluster labels defined by Eiler and Bertilsson (20): the *Actinobacteria* group I (140 sequences) and the *Actinobacteria* group IV (96 sequences). Apart from these two groups, one sequence belonged to the *Actinobacteria* group III and another group included eight unidentified *Actinobacteria* sequences (Table 3). The *Actinobacteria* group I comprised nine OTUs (Actino I.1 - Actino I.9) (Table 3) (see supplemental material). More than 60% of the sequences in this cluster were distributed to two OTUs ( Actino I.5 and Actino I.8), containing 37 and 51 sequences, respectively. Within *Actinobacteria* group IV, the lake sequences fell into seven OTUs (Actino IV.1-Actino IV.7) (see supplemental material). Two OTUs (Actino IV.4 and Actino IV.7) accounted for more than 85% of all the *Actinobacteria* group IV sequences, and for more than 16% of all the sequences found in this study (Table 3).

**(ii) *Proteobacteria* 16S rRNA gene sequences.** Three groups could be identified among the *Proteobacteria* sequences, the *Alpha*, *Beta* and *Gammaproteobacteria* subdivisions, including 76, 76 and 13 sequences, respectively (see supplemental material). Two and four sequences, identified as possible *Delta* and *Epsilonproteobacteria* respectively, were not included in this section because of their low percentage of similarity with cultured

*Proteobacteria* (Table 3). Within the *Alphaproteobacteria* subdivision, 12 OTUs were identified (see supplemental material). All OTUs, except two (alpha 10 and alpha 12), displayed similarities to the nearest cultured relatives, ranging from 92% (alpha 2) to 100% (alpha 4). Nine OTUs were identified within the *Betaproteobacteria* subdivision (see supplemental material). Sequences were identified that were affiliated to various species belonging to the *Oxalobacteraceae*, *Burkholderi*, *Alcaligenaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Methylophylaceae*, *Nitrosomonadaceae* and mostly to the *Comamonadaceae* family, with similarities ranging from 94 to 99% (Table 3). The *Comamonadaceae*-OTU (beta 8) is the largest in the *Betaproteobacteria* subdivision, including 42 sequences corresponding to 55% of all *Betaproteobacteria*, and to over 11% of all the eubacterial sequences found in this study. The *Gammaproteobacteria* subdivision comprised only 13 sequences, distributed among 5 OTUs (see supplemental material) (Table 3). With the exception of the Gamma 4 OTU, we found significant similarities with cultured species (at least 95%). Despite the relatively small intra-cluster similarities in Gamma 1, all sequences from this group shared a high identity with sequences from the *Legionella* genera, justifying the differentiation of this OTU.

**(iii) *Bacteroidetes* 16S rRNA gene sequences.** There was eleven OTUs (see supplemental material) comprising 24 sequences in the *Bacteroidetes* group (C-F-B 1- C-F-B 11). Concerning the C-F-B 7 OTU, all sequences of this group shared a high similarity with a *Flavobacterium* species, justifying the differentiation of this OTU despite intra-cluster similarities <95%. The consensus sequences of all OTUs showed similarities of between 92 and 100% to sequences from uncultured organisms present in the database. When comparing each consensus sequence to its nearest cultured relative, we found low levels of similarity, ranging from 83 to 94% to species belonging to various bacterial families (*Sphingobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Cryomorphaceae* and *Flexibacteriaceae*) except for OTU 7 .

**(iv) “Other” 16S rRNA gene sequences.** The 46 sequences that did not match any of the three major clusters could be divided into 16 OTUs (Table 3). Twelve OTUs displayed insignificant identities with cultured relatives (unidentified 1-12), and two of them even displayed low similarities to sequences from uncultured organisms (> 90%). Of the remaining OTUs, one was affiliated to the *Cyanobacteria* phylum (*Synechococcus*, identity > 99%), and two to *Firmicutes*.

**Table 3.** Information about the OTUs found in the clone libraries, such as their relative abundance expressed as percentage relative to the total number of eubacterial sequences (*i.e.* 480), their intra-OTU similarity, the affiliation and percentage similarity of the consensus sequence of each cluster with the nearest uncultured and the nearest cultured relative and their accession number. Additional details are given concerning the environment in which the uncultured sequence was found, and the name of the cultured relative. n. c. s. a.: no cultivated species available. \*: calculation of percentage similarity was not possible if the cluster consisted of a single sequence. n.i.: not included. Actino Unid.: Unidentified *Actinobacteria*.

|              | %    | Intra-cluster similarity | Nearest uncultivated species accession no., % similarity, environment  | Nearest cultivated species accession no., % similarity, species name  |
|--------------|------|--------------------------|--|---|
| Actino I.1   | 0.6  | 98%                      | AB021332, 97%, activated sludge  | n. c. s. a.   |
| Actino I.2   | 0.4  | 99%                      | AJ575556, 98%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino I.3   | 1.9  | 95-99%                   | AJ575556, 99%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino I.4   | 0.6  | 99%                      | AJ536838, 99%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino I.5   | 7.0  | 98-99%                   | AJ575556, 99%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino I.6   | 3.1  | 98-99%                   | AB154303, 99%, eutrophic lake  | n. c. s. a.   |
| Actino I.7   | 1.7  | 99%                      | AB154303, 96%, eutrophic lake  | n. c. s. a.   |
| Actino I.8   | 10.6 | 98-100%                  | AJ575556, 99%, lake<br>AF316665, 99%, crater lake                      | n. c. s. a.   |
| Actino I.9   | 1.7  | 97-100%                  | AY752098, 99%, oligo-mesotrophic lake<br>AJ344200, 99%, eutrophic pond | AJ007290, 91%, <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ( <i>Acidothermaceae</i> )<br>AJ512462, 91%, <i>Kibdelosporangium albatum</i> ( <i>Pseudonocardiaceae</i> ) |
| Actino IV.1  | 0.8  | 97-100%                  | AJ007641, 99%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino IV.2  | 1.5  | 99-100%                  | AJ277699, 95%, rice paddy soil<br>AY192288, 95%, Alpine soil           | n. c. s. a.   |
| Actino IV.3  | 0.8  | 98-99%                   | AJ277699, 96%, rice paddy soil   | n. c. s. a.   |
| Actino IV.4  | 6.2  | 97-99%                   | AJ575535, 99%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino IV.5  | 0.4  | 99%                      | AB154303, 99%, eutrophic lake  | n. c. s. a.   |
| Actino IV.6  | 0.2  | *                        | AJ575529, 95%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino IV.7  | 10.2 | 98-99%                   | AJ575529, 99%, lake  | n. c. s. a.   |
| Actino III   | 0.2  | *                        | AF497895, 99%, estuary   | 96%, AY082800, <i>Microbacterium</i> sp. ( <i>Microbacteriaceae</i> )   |
| Actino Unid. | 1.7  | 99%                      | AY387354, 92%, soil  | 88%, AJ517363, <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>  |
| Alpha 1      | 0.4  | 100%                     | AJ292596, 96%, soil  | AB056321, 94%, <i>Kozakia baliensis</i> ( <i>Acetobacteraceae</i> )   |

Chapitre III – Résultats relatifs aux travaux expérimentaux

|          |      |        |  |   |
|----------|------|--------|--|---|
| Alpha 2  | 0.4  | 99%    | AY203783, 95%, basalt aquifer,                         | Z29616, 92%, <i>Azospirillum amazonense</i> ( <i>Rhodospirillaceae</i> )            |
| Alpha 3  | 0.2  | *      | AJ290032, 97%, lake                                    | AB119207, 97%, <i>Beijerinckia</i> sp. ( <i>Beijerinckiaceae</i> )                  |
| Alpha 4  | 0.4  | 99%    | AB193878, 100%, deep-sea hydrothermal vent water       | AY749436, 100%, <i>Sphingomonas</i> sp. ( <i>Sphingomonadaceae</i> )                |
| Alpha 5  | 0.6  | 99%    | AY562320, 99%, river                                   | AY584572, 99%, <i>Sphingomonas</i> sp. ( <i>Sphingomonadaceae</i> )                 |
| Alpha 6  | 0.4  | 99%    | AF531008, 100%, lake                                   | AF321036, 99%, <i>Sphingomonas</i> sp. ( <i>Sphingomonadaceae</i> )                 |
| Alpha 7  | 0.2  | *      | AY509406, 99%, lake                                    | AB101543, 97%, <i>Catellibacterium nectariphilum</i> ( <i>Rhodobacteraceae</i> )    |
| Alpha 8  | 0.4  | 100%   | AY562320, 99%, river                                   | AY584572, 99%, <i>Sphingomonas</i> sp. ( <i>Sphingomonadaceae</i> )                 |
| Alpha 9  | 0.2  | *      | AY863094, 99%, wastewater treatment pool               | AJ247194, 99%, ( <i>Asticcacaulis excentricus</i> ) ( <i>Caulibacteraceae</i> )     |
| Alpha 10 | 0.6  | 100%   | AY328843, 98%, drinking water bacteria                 | n. c. s. a.   |
| Alpha 11 | 0.2  | *      | AF132139, 98%, endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. | AF069496, 93%, <i>Candidatus Odysella thessalonicensis</i> ( <i>Rickettsiales</i> ) |
| Alpha 12 | 11.7 | 99%    | AY752103, 100%, oligo-mesotrophic lake                 | n. c. s. a.   |
| Beta 1   | 0.6  | 96-99% | AY752109, 98%, oligo-mesotrophic lake                  | AY429714, 97%, <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium (groundwater)                      |
| Beta 2   | 2.1  | 95-99% | AF534432, 97-99%, arctic lake                          | AY584579, 97%, <i>Polynucleobacter</i> sp. ( <i>Burkholderiaceae</i> )              |
| Beta 3   | 0.2  | *      | AY544234, 97-99%, lake                                 | ABO39335, 95%, <i>Bordetella</i> sp. ( <i>Alcaligenaceae</i> )                      |
| Beta 4   | 0.4  | 98%    | AF534426, 99%, arctic lake                             | AJ318917, 94%, <i>Dechlorimonas</i> sp. ( <i>Rhodocyclaceae</i> )                   |
| Beta 5   | 2.1  | 99%    | AJ421928, 96%, biofilms in river                       | AB193725, 95%, <i>Methylophilus leisingeri</i> ( <i>Methylophylaceae</i> )          |
| Beta 6   | 1.2  | 98-99% | Z99999, 99%, lake                                      | AY123800, 96%, <i>Nitrosospira briensis</i> ( <i>Nitrosomonadaceae</i> )            |
| Beta 7   | 0.2  | *      | AF203513, 95%, arctic ocean                            | AY429718, 94%, <i>Limnobacter</i> sp. (groundwater) ( <i>Burkholderiaceae</i> )     |
| Beta 8   | 11.4 | 95-99% | AY874036, 99%, lake                                    | AF235013, 99%, <i>Acidovorax</i> sp. ( <i>Comamonadaceae</i> )                      |
|          |      |        | AY562357, 99%, river                                   |   |

|                |     |         |  |   |
|----------------|-----|---------|--|---|
|                |     |         |  | AF435948, 99%, <i>Rhodoferax ferrireducens</i> ( <i>Comamonadaceae</i> )                        |
| Beta 9         | 0.2 | *       | J853520, 95%, leached in waste landfill                              | AJ289885, 94%, <i>Limnobacter thiooxidans</i> ( <i>Burkholderiaceae</i> )                       |
| Gamma 1        | 1.0 | 89-100% | AY662002, 97%, groundwater   | X97359, 96%, <i>Legionella</i> sp. ( <i>Legionellaceae</i> )                                    |
| Gamma 2        | 0.8 | 98-99%  | AY661999, 99%, groundwater   | AJ414655, 99%, <i>Methylobacter</i> sp. ( <i>Methylococcaceae</i> )                             |
| Gamma 3        | 0.2 | *       | AF286035, 99%, coastal marine sediments                              | Z76666, 99%, <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> ( <i>Pseudomonadaceae</i> )                   |
| Gamma 4        | 0.2 | *       | AB010868, 90%, deep sea  | AY136121, 90%, <i>Marinobacter</i> sp. (lake) ( <i>Alteromonadaceae</i> )                       |
| Gamma 5        | 0.4 | 99%     | AY549549, 99%, endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp.               | AJ441082, 95%, <i>Rheinheimera baltica</i> ( <i>Chromatiaceae</i> )                             |
| C-F-B 1        | 1.0 | 99%     | AJ295641, 99%, mining waste piles                                    | AJ438171, 94%, <i>Pedobacter africanus</i> ( <i>Sphingobacteriaceae</i> )                       |
| C-F-B 2        | 0.2 | *       | AF361199, 92% <i>Cytophagales</i> bacterium, mesoeutrophic reservoir | AY612170, 85%, <i>Riemerella anatipestifer</i> ( <i>Flavobacteriaceae</i> )                     |
| C-F-B 3        | 0.2 | *       | AF534434, 94%, arctic lake   | AY553294, 83%, <i>Sejongia jeonii</i> ( <i>Flavobacteriaceae</i> )                              |
| C-F-B 4        | 0.4 | 100%    | AY509263, 100%, lake   | AB125062, 90%, <i>Owenweeksia hongkongensis</i> ( <i>Cryomorphaceae</i> )                       |
| C-F-B 5        | 0.6 | 96-100% | AF540042, 96%, lake water  | AB176674, 91%, <i>Cryomorphaceae</i> bacterium ( <i>Cryomorphaceae</i> )                        |
| C-F-B 6        | 0.6 | 96%     | AF268288, 99%, freshwater phytoplankton bloom                        | ABO78042, 93%, <i>Flexibacter aggregans</i> subsp. <i>catalaticus</i> ( <i>Cryomorphaceae</i> ) |
| C-F-B 7        | 0.6 | 92-93%  | AF534436, 97%, arctic lake   | AY662494, 97%, <i>Flavobacterium psychrophilum</i> ( <i>Flavobacteriaceae</i> )                 |
| C-F-B 8        | 0.2 | *       | AY187536, 99%, river   | AB015532, 87%, <i>Cytophaga</i> sp. ( <i>Flexibacteraceae</i> )                                 |
| C-F-B 9        | 0.6 | 94-99%  | ASO252666, 96%, agricultural soil                                    | AF361187, 93%, <i>Flexibacter</i> sp. ( <i>Cryomorphaceae</i> )                                 |
| C-F-B 10       | 0.2 | *       | AY562342, 99%, river   | AJ535729, 91%, <i>Arcicella aquatica</i> ( <i>Flexibacteraceae</i> )                            |
| C-F-B 11       | 0.4 | 99%     | AJ697706.1, 99%, mesotrophic lake                                    | AY533664, 93%, <i>Hongiella marincola</i> ( <i>Flexibacteriaceae</i> )                          |
| Unidentified 1 | 0.8 | 99-100% | AF418964, 95%, freshwater reservoir                                  | U96300, 90%, <i>Helicobacter</i> sp. $\epsilon$ - <i>Proteobacteria</i>                         |
| Unidentified 2 | 0.4 | 100%    | ASO252613, 97%, soil   | n. c. s. a.   |
| Unidentified 3 | 0.2 | *       | AF432621, 95%, soil  | n. c. s. a.   |
| Unidentified 4 | 0.2 | *       | AY922176, 87%, soil,   | CLA233939, 87%,   |

|                      |     |         |  |  |
|----------------------|-----|---------|--|--|
|                      |     |         | uncultured<br><i>Deltaproteobacteria</i>   | <i>Chondromyces lanuginosus</i><br>( <i>Deltaproteobacteria</i> )                              |
| Unidentified 5       | 0.2 | *       |  |  |
| Unidentified 6       | 0.6 | 99%     | AY344414, 89%, Hawaiian<br>Archipelago<br>AY921932, 87%, soil,<br>uncultured <i>Planctomycetes</i><br>clone  | n. c. s. a.  |
| Unidentified 7       | 0.2 | *       | AY337041, 99%, river,<br>uncultured<br><i>Verrucomicrobiales</i>   | AF075271, 86%, <i>Alterococcus</i><br><i>agarolyticus</i> ( $\gamma$ - <i>Proteobacteria</i> ) |
| Unidentified 8       | 0.6 | 97%     | AF316720, 97%, crater lake<br>AF337199, 98%,<br>mesotrophic lake, uncultured<br>bacteria<br>UBA534638, 96%, mine<br>waste pile, uncultured<br><i>Nitrospirae</i> bacterium | NSPY14644, 94%, <i>Nitrospira</i><br>sp. ( <i>Nitrospirae</i> )                                |
| Unidentified 9       | 0.2 | *       | AF540048.1, 99%, lake<br>AY509521, 99%, lake,<br>uncultured <i>Fibrobacteres</i><br>bacterium  | ABO78046, 93%, <i>Flexibacter</i><br><i>canadensis</i> (Bacteroides)                           |
| Unidentified 10      | 0.4 | *       | AF540048, 99%, lake  | AY518549, 87%, <i>Bacillus</i><br><i>solfatarensis</i> ,                                       |
| Unidentified 11      | 2.1 | 96-99%  | AF316759, 99%, crater lake<br>J441227, 86%, uncultured<br>green-non sulfur bacterium<br>AB116439, 85%, uncultured<br><i>Chloroflexi</i> bacterium                          | n. c. s. a.  |
| Unidentified 12      | 0.2 | 99%     | AF316775, 99%, crater lake<br>AF465657, 90%, uncultured<br><i>Planctomycetales</i>   | n. c. s. a.  |
| Unidentified 13      | 0.2 | *       | AF316767, 99%, crater lake<br>AY921932, 88%, uncultured<br><i>Planctomycetes</i>   | n. c. s. a.  |
| <i>Cyanobacteria</i> | 1.5 | 98-100% |  | AY151243, 99%,<br><i>Synechococcus</i> sp. (lake)  |
| <i>Firmicutes</i> 1  | 0.2 | *       |  | AY030342, 99%,<br><i>Staphylococcus epidermis</i>  |
| <i>Firmicutes</i> 2  | 0.4 | 100%    |  | AB073362, 99%, <i>Paenibacillus</i><br><i>alginolyticus</i>                                    |

**Origin of sequences and diversity analyses of the clone libraries.** Only 12 out of the 70 à vérifier identified OTUs representing 25% of all eubacterial sequences, displayed significant (at least 95%) similarities with sequences from cultured species (mostly *Proteobacteria* OTUs) (Table 3), meaning that most of them (75%) were related to uncultured

microorganisms. In addition, 6 OTUs representing 3.35% of all sequences and assigned to the *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* or *Gammaproteobacteria*, showed similarities of < 95% with both uncultured and cultured species and are likely to be new genera.

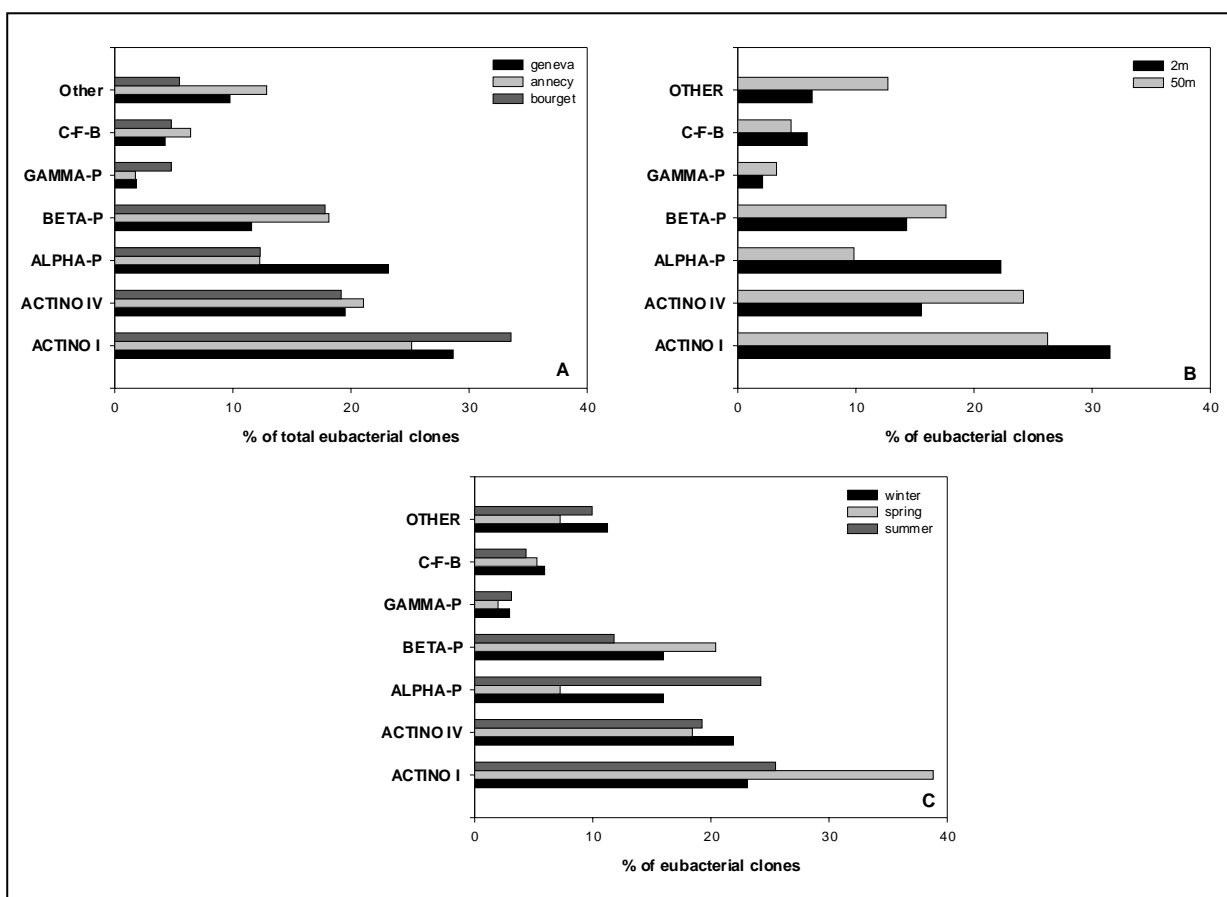
Thirty-one OTUs were found to be affiliated to sequences isolated from freshwater habitats, and the remaining affiliated to sequences isolated from soil, sediments, marine environments or laboratory cultures (Table 3). With regard to the number of sequences, 85% of the eubacterial sequences showed the highest levels of similarity to sequences retrieved from lake systems, 2.1% to those from rivers or in groundwater and 2.7% to those from marine sources (Table 3). The remaining percentage (*ca.* 10%) was mainly affiliated to sequences from soil (4.8%), sediment or sludge (3.4%).

The results of the diversity analyses in the 18 clone libraries are reported in Table 2. The number of OTUs identified in each clone library ranged from 10 to 16, with an average of 13 OTUs per clone library. Rarefaction analyses showed that our sampling was not sufficient to appreciate the real diversity in most of the samples (not shown). This was confirmed by the evenness and coverage, ranging from 0.5 to 0.83 and from 36 to 88%, respectively. Diversity estimates, such as the Chao1 estimator, allowed us to speculate about the real number of OTUs (richness) of a given sample. The expected richness was between  $12.5 \pm 6$  and  $35.5 \pm 16.4$ . The Shannon displayed values spanning 1.7 - 2.7 and corresponding to a relatively high level of diversity.

**Distribution of the main bacterial divisions among lakes, depth and season.** Taking all the data into consideration, we calculated the relative abundance of the main taxonomic groups (*Actinobacteria* I and IV, *Alpha*, *Beta* and *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, “others”) for each lake, depth and season (Fig. 1A, B, C). These groups were fairly equally distributed among the three lakes (Chi2 test,  $P < 0.01$ ), although some groups, such as *Alphaproteobacteria*, did seem to be slightly more abundant in Lake Geneva. There were significant differences (Chi2 test) in the relative proportions of these groups related to season. Some groups displayed seasonal trends, such as the *Alphaproteobacteria* which showed low densities in spring, in contrast to the *Betaproteobacteria* and the *Actinobacteria* I groups. With regard to depth, there were also significant differences (Chi2 test) between the relative distributions of the groups. The *Alphaproteobacteria* and *Actinobacteria* IV groups displayed opposite tendencies, the former being more abundant at 2 m, and the latter at 50 m. Sørensen’s similarity coefficients, calculated on the basis of the presence or absence of

sequences within the 60 OTUs, were very similar in all three lakes. They ranged from 0.62 to 0.66, confirming the relatively high degree of similarity between the three lakes.

**Fig 1.** Relative proportions of sequences belonging to *Actinobacteria* groups I (ACTINO I) and IV (ACTINO IV) *Alpha*, *Beta* and *Gammaproteobacteria* (ALPHA-, BETA- and GAMMA-P), *Bacteroidetes* (C-F-B) and “other” for the lake (A), the depth (B) or the season (C).

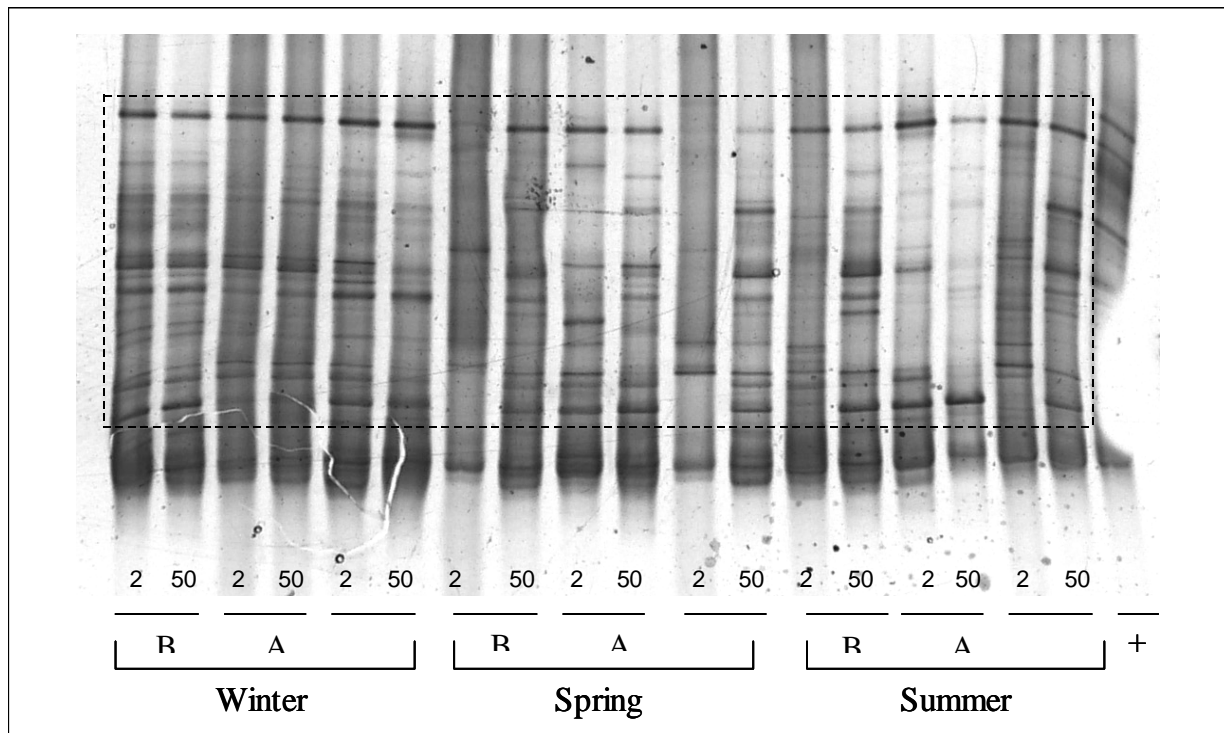


**DGGE fingerprint analyses.** Thirty different bacterial sequence types (bands) were detected (Fig. 2). In each sample, from 10 to 21 bands were found, with an average of 16 in each. Three bands were found in all the samples, one of these was dominant in terms of intensity. In winter, there was no difference between the samples with regard to depth, whereas differences in DGGE patterns were detected in spring and summer. The cluster analysis of DGGE banding patterns from all samples highlighted the combined influence of the season and of the water depth sampled, on the bacterioplankton assemblage (Fig. 3). Bacterioplankton communities seem to depend less on the lake system studied. All 2 m-samples clustered together in spring and summer as did all 50 m-samples at the same periods. On the other hand, both 2 m-samples and 50 m-samples clustered together in winter, except the Lake



Geneva sample at 50 m,. Sørensen's similarity coefficient was rather high (0.80-0.92), indicating the presence of very similar bacterial assemblages.

**Fig 2.** DGGE band patterns obtained in the three lakes (Annecy, Bourget and Geneva), during three seasons (Winter, Spring and Summer) and at two depths (2 m and 50 m). The square outlined by a dotted line highlights the area in the gel that was kept for further analyses.



## Discussion

**Comparison of our sequence data set with those in gene bank databases.** Using cloning sequencing, 480 clones were identified, and were distributed within 71 OTUs belonging to different eubacterioplankton divisions. Rarefaction analyses demonstrated that the number of sequences retrieved from each clone library could not be regarded as an exhaustive inventory. Indeed, if we hope to get a realistic estimation of the total species richness and of the proportions of the different species in each sample, the number of clones analyzed in each clone libraries must be assumed to be much greater.

As previously reported in other lakes, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and the *Bacteroidetes* were the most abundant groups (40, 41). This finding is consistent with other studies indicating that *Actinobacteria* may constitute a substantial fraction (as much as 60%) of total freshwater bacterioplankton (27, 72, 83). As reported by Eiler and Bertilsson (20), the

*Actinobacteria* cluster I included the largest number of *Actinobacteria* sequences, followed by *Actinobacteria* cluster IV. In cluster I, Actino 1.5 and Actino 1.3 exhibited strong similarities with sequences affiliated to sequences comprised within STA2-30 (from freshwater ecosystems) and within ACK-M1 (freshwater and marine), respectively, both defined by Zwart *et al.* (92), and comprised within the aquatic hgcI cluster of Glöckner *et al.* (27). For the *Actinobacteria* group IV, Actino IV.4 and IV.6, which were strongly affiliated to the MED0-06 cluster (freshwater and marine) and to the CL500-29 cluster (exclusively freshwater), respectively, also defined by Zwart *et al.* (92). More surprisingly, no sequences belonging to the *Actinobacteria* II group was found, whereas according to Eiler and Bertilsson this group constitutes an important fraction of eubacterial communities in freshwater ecosystems (20). Similarly, only one sequence belonging to group III was identified.

The second most abundant division was that of the *Proteobacteria*, containing 165 sequences. Seventy-six (16%) of them belonged to the *Alphaproteobacteria*, 76 (16%) to the *Betaproteobacteria* and 13 (2.7%) to the *Gammaproteobacteria*. Sequence analysis of bacterioplankton assemblages isolated from different aquatic ecosystems has revealed the predominance of these three out of the five *Proteobacteria* subdivisions (26). 74% of all the *Alphaproteobacteria* sequences detected belonged to a cluster for which no cultured relative could be found (alpha 12-OTU), but which has been identified in several lakes (named Alpha V by Glöckner *et al.* and Lindström *et al.* (27, 51) and LD12 by Eiler and Bertilsson and Zwart *et al.* (20, 93)). This cluster was designed as being an exclusively freshwater cluster, but it forms a monophyletic aquatic supergroup (91) with the marine SAR11 cluster (58).

The proportion of *Betaproteobacteria* ranged from 12 to 18% in the three lakes studied. Similar values have been found in other freshwater ecosystems (26, 35). All the *Betaproteobacteria* OTUs identified in our study showed strong similarities with published sequences from uncultured organisms, but also with cultured species. Members of the  $\beta$ 2-OTU were affiliated to a cosmopolitan freshwater lineage (beta II) that includes the endosymbiont ultramicrobacteria *Polynucleobacter necessarius* (31). Furthermore, high similarities were found between sequences of the  $\beta$ 5-OTU and those belonging to the widespread LD28 (beta IV, (27)) freshwater cluster (92, 93), and one sequence was related to the freshwater clade GKS98 comprised within the beta III cluster of Glöckner *et al.* (27). The consensus sequence of the largest OTU (beta 8) including 55% of all *Betaproteobacteria* sequences, has the greatest similarity with the sequences of the *Rhodoferrax* sp. BAL47 cluster (92), which is itself comprised within the broader beta I cluster reported by Glöckner *et al.* (27) in marine and in freshwater ecosystems.

Clones affiliated to the *Gammaproteobacteria* subdivision represented only a small fraction (2 to 5% within each lake) of the sequence pool, which mirrors the situation found in pelagic systems (26). All OTUs in this group were strongly affiliated both to uncultured (mostly freshwater ones) or cultured species. The nearest relatives belonged to various taxonomic families, e.g. *Legionellaceae*, *Methylococcaceae* and *Pseudomonadaceae*, which were found to constitute an important fraction of the *Gammaproteobacteria* subdivision in the study of Eiler and Bertilsson (20). Moreover, sequences within the Gamma 2 OTU were affiliated to sequences from the *Methylobacter psychropilus* cluster found in freshwater, coastal and estuary waters (92).

The sequences of the *Bacteroidetes* division represented only 5% of the total eubacterial sequences obtained in this study. Interestingly the small number of *Bacteroidetes* clones (24) was divided between a high number of OTUs (9). They correspond to no more than 6% of the total eubacterial counts in these three lakes, whereas *Bacteroidetes* is known to dominate heterotrophic bacterial communities in various aquatic ecosystems, (11, 26, 47). In another study (20), bacteria of the *Bacteroidetes* division constituted a substantial fraction of eubacterial assemblages within four lakes in which blooms of various *cyanobacteria* occur. Despite the high abundance of the cyanobacteria *P. rubescens* in Lake Bourget since 1997 (43), we found similar proportions of *Bacteroidetes* in all three lakes.

The comparison of our sequence data set with those in the literature showed some differences in the community composition, which can partially be explained by our method of collecting bacterial DNA. Indeed, we can not rule out the possibility that the fact that our samples were prefiltered across a 2- $\mu\text{m}$  pore-size membrane could have eliminated some species, for example in the *Bacteroidetes* group, which is known to contain many filamentous forms. Particle-attached bacteria, and large organic aggregates were also probably eliminated from our sampling in this way. There is some evidence that the number of particle-attached bacteria can be large (28, 71). Moreover, phylogenetic analyses assessed on free-living and particle-attached bacteria indicate that these two communities sometimes exhibit significant structural differences (12, 15) but sometimes do not (73). The  $<0.2 \mu\text{m}$  fraction that we lost could well have contained very small bacteria, known as ultramicrobacteria ( $<0.1\mu\text{m}^3$ ), which have been shown to be present in different ecosystems (32, 58). It is also impossible to rule out the possibility of other sources of bias, such those linked to DNA extraction and preferential PCR amplification.

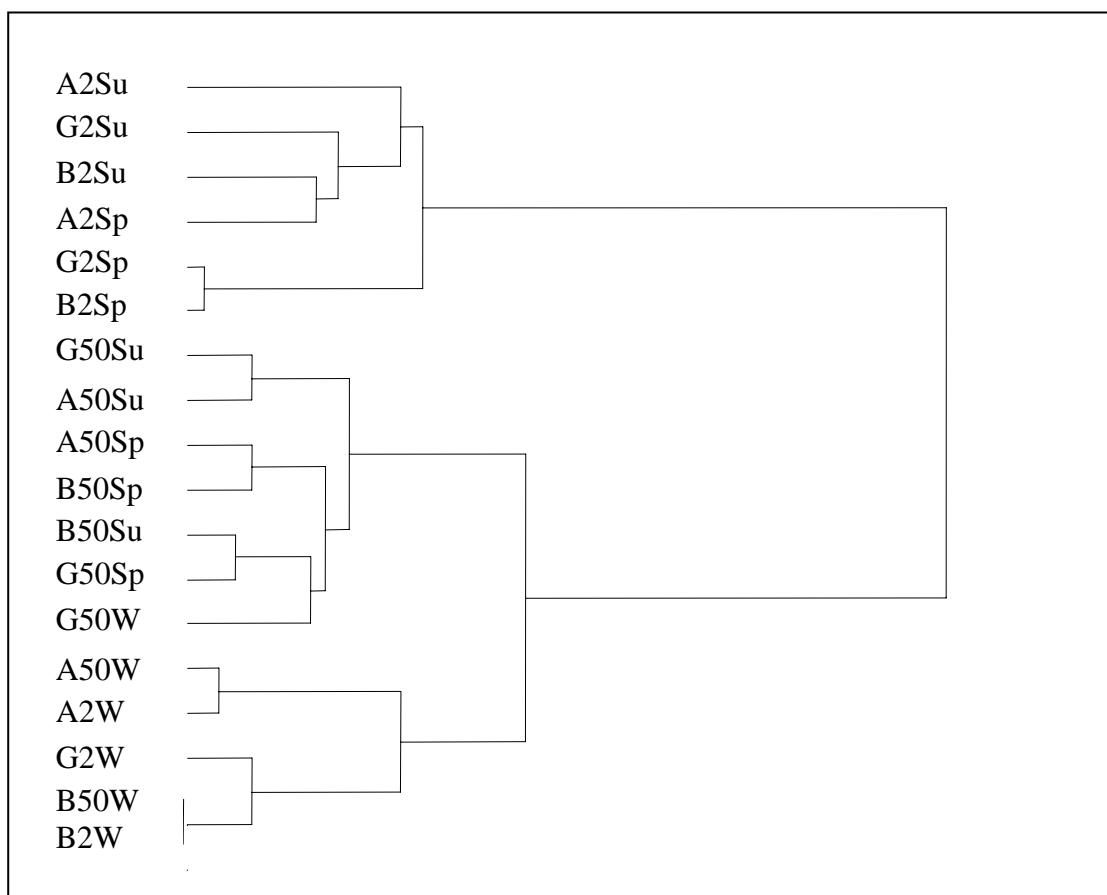
**Relative influence of allochthonous bacteria on the community composition of the three lakes studied.** Sequence analyses revealed that the great majority of our sequences were affiliated to the 16S rRNA gene sequences found in other freshwater habitats, mostly in lakes (5, 13, 20, 27, 66, 76, 80, 83, 92, 94). Less than 10% of the sequences were affiliated to sequences that did not originate from freshwater ecosystems, indicating that terrestrial and aquatic ecosystems are characterized by specific bacterial communities. A similar finding has also been reported by Warneke *et al.* (83), on 16S rRNA genes from *Actinobacteria*.

Moreover, it appears also that our sequences shared the highest similarities with other lake sequences rather than with sequences from rivers, suggesting that lakes have a specific BCC. Limnic and lotic BCCs have been compared in several studies, and very divergent results have been obtained using fingerprinting approaches. Indeed, inlet bacteria have been reported to have weak to strong influences on the bacterial communities of lakes and reservoirs (e.g. 18, 24, 52, 75). In the study of Simek *et al.* (75) it was shown that hydrological processes and retention time of the lakes were the most important parameters involved in the relative influence of inlet on the BCC of lakes.

**Relative influence of the lake origin, the depth and the season on the BCC.** There were significant differences in the BCC assessed by sequencing with regard to the sampling depth and season. In the case of depth, most of these differences concerned the relative proportions of *Actinobacteria* IV and *Alphaproteobacteria*, whereas in that of the season, most of them concerned the relative proportions of *Actinobacteria* I and again of *Alphaproteobacteria*. One possible hypothesis is that *Actinobacteria* and *Proteobacteria* inhabit different ecological niches. *Actinobacteria* are known to be efficient consumers of low levels of organic carbon, and to be able to grow at low temperatures (27). Moreover, they possess peroxidases that enable them to cleave complex organic materials (55, 64). On the other hand, *Proteobacteria* have been shown to outcompete *Actinobacteria* in systems with a high nutrient loads, due to their rapid growth response (5, 32). This is not a very original finding as numerous papers have demonstrated that these two parameters have a strong influence on the BCC of lakes and ponds (e.g. 81). The availability of nutrients such (DOM, inorganic nutrients...), temperature, pH, Secchi depth, temperature, O<sub>2</sub>, (13, 23, 42, 50, 56, 87-89), system productivity parameters such as chl *a* (38) and bacterivory and lysis by viruses (30, 74, 78), may explain seasonal and depth differences in the BCC.

Much more interesting is the fact that sequencing and DGGE highlighted only slight differences in space and time, in the BCCof the three lakes, despite their different trophic status.

**Fig. 3.** Cluster analysis of the similarity of DGGE profiles at the different sampling seasons (W= winter, Su= summer, Sp= spring) and at depths of 2 and 50 m for lakes Annecy (A), Bourget (B) and Geneva (G).



Sequencing did not reveal any differentiation with regard to the global distribution of the most important bacterial divisions (*Actinobacteria* I and IV, *Alpha*, *Beta* and *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, “others”). In addition, most of the main OTUs were found in two or three lakes, but it was not possible to compare their relative proportions in each lake, limiting the phylogenetic resolution of this comparison. In the same way, the DGGE band pattern cluster analysis clearly showed that the influence of depth and season was greater than that of the lake of origin. This great similarity between the lakes was confirmed when Sorensen’s similarity coefficients were calculated and gave values  $>0.83$  for DGGE and  $>0.62$  for sequencing. The difference between these two values could be perhaps

explained by the different sensitivities of the two methods. In this way, as previously reported in different papers (see review in 17), it must be noticed that only the major taxa are detected by DGGE, limiting the resolution of this approach for high diversified communities.

In a similar study using ARISA to monitor BCC variations in three lakes with different trophic status in Wisconsin, Yannarell and colleagues (88, 89) found that most of the variations in the ARISA profiles were attributable to the lake of origin. They showed also that differences in the diversity of bacterioplankton communities were best explained by regional (northern *versus* southern lakes) and landscape level (seepage *versus* drainage lakes) factors, and only to a minor extent by temporal and environmental variables. In other two studies (6, 81), contrasting BCC values were also found when neighboring lakes were compared. On the other hand, Lindström (50) did not report any differences attributable to the lake of origin when comparing the BCC values of five Swedish lakes differing in trophic status. Moreover, in another study, Lindström and Leskinen (51) found area-specific taxa when comparing BCC values for several neighboring lakes located in three different geographic regions in Scandinavia.

Thus, it appears from our data and from this bibliographic analysis that the relative impact of local (intra-lake) *versus* regional selective pressures on the BCC can vary considerably. In our study model, all three lakes were deep lakes in which the hypolimnic layer is very large. In this layer, the environmental parameters are very similar in all three lakes, and in winter they are also very similar throughout the entire water column. Thus, the lack of any obvious difference in the BCC of the three lakes at the scale of the year could be explained by their common environmental conditions, such as water temperature and pH, in a large part of the water column. Differences generated by lake-specific environmental pressures occurred only in the epilimnic layer, and only during a small part of the year. This hypothesis fits in with that of Yannarell and Triplett (89) about the possible impact of water temperature as a major structuring force on the BCC at the regional scale.

For all these findings, we are fully aware that multiple biases arising from the molecular approaches for example, probably modified the representation of the eubacterial community composition in the three lakes studied. But, we don't have actually any method allowing to avoid such bias. Nevertheless, this study has provided strong evidence that most eubacterial sequences recovered from our lake systems can be grouped into freshwater bacterial clusters that seem to be globally distributed. The fact that the same bacterial clusters are found in geographically distant or neighboring lakes with differing biological and physico-chemical characteristics suggest that these clusters possess similar ecological

functions, allowing them to compete successfully in these ecosystems. Another interesting finding of our study was that most of the sequences did not match those of any cultured species, clearly demonstrating, despite their bias, the usefulness of molecular techniques to assess the diversity of microbial communities. Finally, this study has shown that the BCC values for our three lakes seem to display little influence of allochthonous inputs from terrestrial ecosystems, and that shared structuring forces in a large part of their water column (hypolimnion) probably account for the similarity of their BCCs.

**Acknowledgements.** This work was funded by the “Emergence” research program of the Région Rhône-Alpes. We would like to thank L. Vindigni, V. Lestavel and P.Y. Peseux for their help in establishing clone libraries and G. Paolini and B. LeBerre for their help in sampling. The English text has been checked by M. Ghosh. We would like to thank the three anonymous reviewers for their helpful criticisms.



## References

1. **AFNOR**, 1982. Essais des Eaux : Norme Française. NFT 90-023, AFNOR, 10 p.
2. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, M. W., and D. Lipman**. 1997. Gapped BLAST and PSI-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Ac. Res.* **25**:3389-3402.
3. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer**. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev* **59**:143-169.
4. **Bruns, A., U. Nubel, H. Cypionka, and J. Overmann**. 2003. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1980-1989.
5. **Burkert, U., F. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann, and J. Pernthaler**. 2003. Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6550-6559.
6. **Casamayor, E. O., H. Schäfer, L. Bañeras, C. Pedrós-Aliós, and G. Muyzer**. 2000. Identification of spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:499-508.
7. **Cho, J.-C., and J. M. Tiedje**. 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5448-5456.
8. **Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, D. M. McGarrell, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje**. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucl. Ac. Res.* **Jan 1** ;**33** (Database Issue):D294-D296. doi: 10.1093/nar/gki038.
9. **Colwell, R. K.** 2005. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
10. **Connon, S. A., and S. J. Giovannoni**. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3878-3885.
11. **Cottrell, M. T., and D. Kirchman**. 2000. Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophage-Flavobacteria* cluster consuming low-

- and high- molecular dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1692-1697.
12. **Crump, B. C., V. E. Armbrust, and J. A. Baross.** 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3192-3204.
  13. **Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr, and J. E. Hobbie.** 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2253-2268.
  14. **Curtis, T. P., W. T. Sloan, and J. W. Scannell.** 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *PNAS* **99**:10494-10499.
  15. **DeLong, E. F., D. G. Franks, and A. L. Alldredge.** 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **38**:924-934.
  16. Dorigo, U., S. Jacquet, and J.F. Humbert. 2004. Cyanophage diversity, inferred from *g20* gene analysis, in the largest natural lake in France, Lake Bourget. *Appl. Env. Microbiol.* **70**:1017-1022.
  17. Dorigo, U., L. Volatier, and J.F. Humbert. 2005. Molecular approaches for the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities: a minireview. *Water Res.* **39**:2207-2218.
  18. **Dumestre, J. F., E. O. Casamayor, R. Massana, and C. Pedros-Alio.** 2002. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (France Guiana). *Aquat. Microb. Ecol.* **26**:209-221.
  19. **Dykhuisen, D. E.** 1998. Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria?, p. 25-33. *In* A. v. Leeuwenhoek (ed.), vol. 73.
  20. **Eiler, A., and S. Bertilsson.** 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* **6**:1228-1243.
  21. **Felsenstein, J.** 1993. Phylogenetic inference programs (PHYLIP), Manual 3.5c. University of Washington, Seattle, Washington.
  22. **Finlay, B. J.** 2002. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Sc. Environ. Microbiol.* **296**:1061-1063.

23. **Fisher, M. M., J. L. Klug, G. Lauster, M. Newton, and E. W. Triplett.** 2000. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microb. Ecol.* **40**:125-138.
24. **Gasol, J. M., M. Comerma, J. C. Garcia, J. Armengol, E. O. Casamayor, P. Kojecka, and K. Simek.** 2002. A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundances, activity, production, and community composition in an eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnol. Oceanogr.* **47**:62-77.
25. **Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, and K. G. Field.** 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **344**:60-63.
26. **Glöckner, F. O., B. M. Fuchs, and R. Amann.** 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3721-3726.
27. **Glöckner, F. O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, and R. Amann.** 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5053-5065.
28. **Grossart, H. P., and M. Simon.** 1998. Significance of limnetic organic aggregates (lake snow) for the sinking flux of particulate organic matter in a large lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **15**:115-125.
29. **Gugger, M., R. Molica, B. Le Berre, P. Dufour, C. Bernard, and J.-F. Humbert.** 2005. Genetic Diversity of *Cylindrospermopsis* Strains (Cyanobacteria) Isolated from Four Continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1097-1100.
30. **Hahn, M. W., and M. G. Hofle.** 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. Minireview. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**:113-121.
31. **Hahn, M. W.** 2003. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5248-5254.
32. **Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Hofle, J. Boenigk, and P. Stadtler.** 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1442-1451.
33. **Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan.** 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, p. 9, *Palaeontologia Electronica*, vol. 4.

34. **Hill, T. C. J., K. A. Walsh, J. A. Harris, and B. Moffet.** 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:1-11.
35. **Hiorns, W. D., B. A. Methé, S. A. Nierzwicki-Bauer, and J. P. Zehr.** 1997. Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2957-2960.
36. **Horner-Devine, C., M. A. Leibold, V. H. Smith, and B. J. M. Bohannan.** 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters* **6**:613-622.
37. **Horner-Devine, C., K. M. Carney, and B. J. M. Bohannan.** 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. Lond.* **271**:113-122.
38. **Horner-Devine, C., M. Lage, D. J. Hughes, and B. J. M. Bohannan.** 2004. A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432**:750-753.
39. **Huber, T., G. Faulkner, and P. Hugenholtz.** 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics Applications Note* **20**.
40. **Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriology* **180**:4765-4774.
41. **Hugenholtz, P.** 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3**:1-8.
42. **Humayoun, S. B., N. Bano, and J. T. Hollibaugh.** 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda Lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1030-1042.
43. **Jacquet, S., J. F. Briand, C. Leboulanger, C. Avois-Jacquet, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, G. Paolini, J. C. Druart, O. Anneville, and J. F. Humbert.** 2005. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget)? *Harmful Algae* **4**:651-672.
44. **Jones, J. G.** 1977. The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology* **7**:67-91.
45. **Jukes, T. H., and C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*, vol. 3. Academic Press, New York.

46. **Kaeberlein, T., K. Lewis, and S. S. Epstein.** 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**:1127-1129.
47. **Kirchman, D.** 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecology* **39**:91-100.
48. **Leboulanger, C., U. Dorigo, S. Jacquet, B. Le Berre, G. Paolini, and J.-F. Humbert.** 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:83-89.
49. **Lindström, E. S.** 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microb. Ecol.* **27**:163-174.
50. **Lindström, E. S.** 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microbial Ecology* **40**:104-113.
51. **Lindström, E. S., and E. Leskinen.** 2002. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology* **44**:1-9.
52. **Lindström, E. S., and A.-K. Bergström.** 2004. Influence of inlet bacteria on bacterioplankton assemblage composition in lakes of different hydraulic retention time. *Limnol. Oceanogr.* **49**:125-136.
53. **Magurran, A. E.** 1988. *Ecological diversity and its measurements.*, p. 179, Princeton University Press, Princeton N.J.
54. **Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston, and E. F. DeLong.** 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:50-56.
55. **Mercer, D., M. Iqbal, P. Miller, and A. McCarthy.** 1996. Screening actinomycetes for extracellular peroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2186-2190.
56. **Méthé, B. A., and J. P. Zehr.** 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect water chemistry? *Hydrobiologia* **401**:77-96.
57. **Miyoshi, T., T. Iwatsuki, and T. Naganuma.** 2005. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1084-1088.

58. **Morris, R. M., M. S. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, W. A. Siebold, C. A. Carlson, and S. J. Giovannoni.** 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**:806-810.
59. **Murray, A. E., J. T. Hollibraugh, and C. Orrego.** 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2676-2680.
60. **Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695.
61. **Nicholas, K. b., and H. B. J. Nicholas** 1997, . GeneDoc: a tool for editing and annoting multiple sequence alignments. Distributed by the author. [Online.] ([www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml](http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml)).
62. **Pace, N.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**:734-740.
63. **Page, R.** 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**:357-358.
64. **Ramachandra, M., D. Crawford, and G. Hertel.** 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:3057-3063.
65. **Rappé, M. S., and S. J. Giovannoni.** 2003. The uncultured microbial majority. *Ann. Rev. Microbiol.* **57**:369-394.
66. **Riemann, L., and A. Winding.** 2001. Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology* **42**:274-285.
67. **Rosello-Mora, R., and R. I. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:39-67.
68. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol* **4**:406-425.
69. **Schauer, M., R. Massana, and C. Pedrós-Alió.** 2000. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**:51-59.

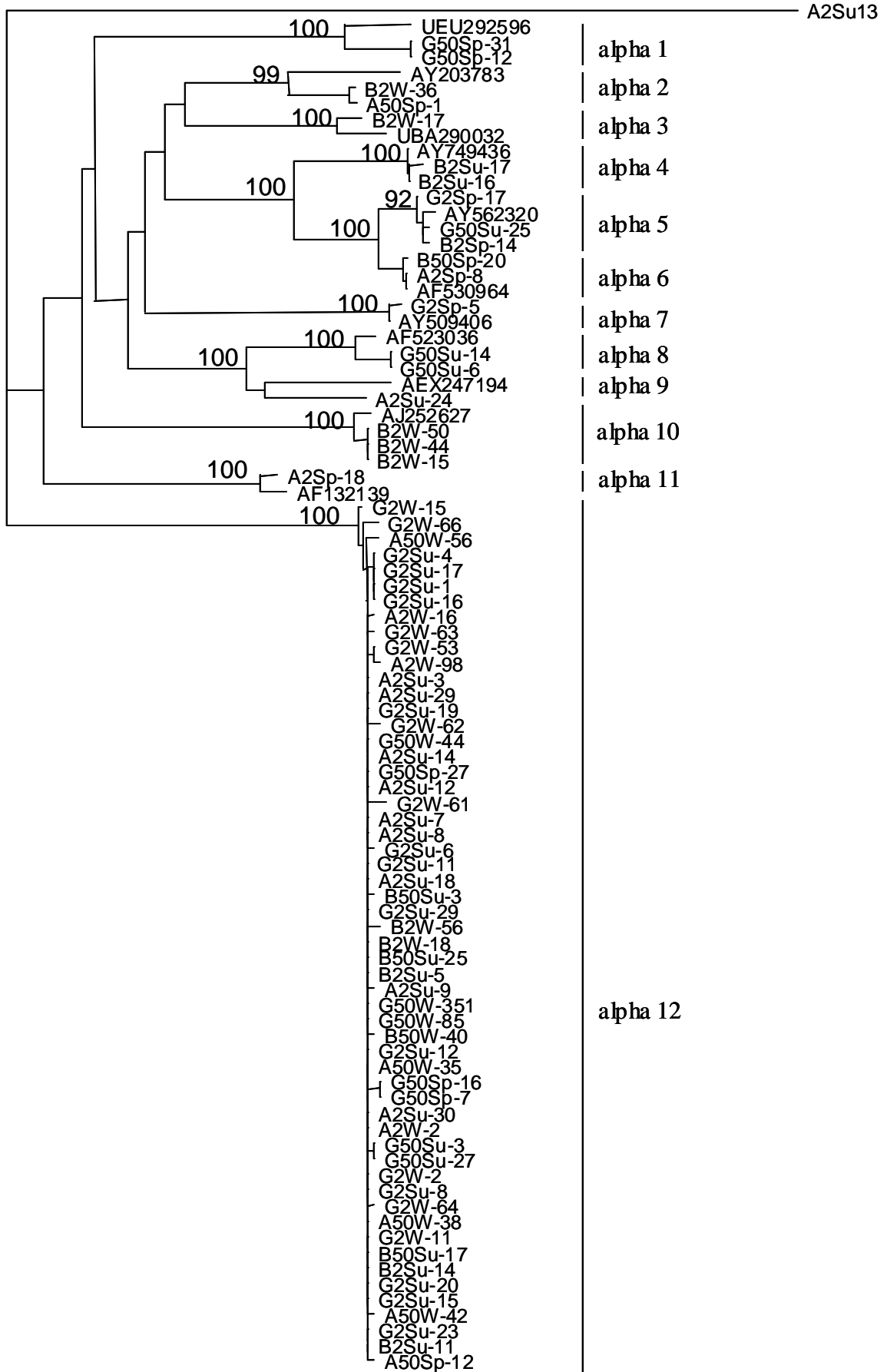
70. **Schauer, M., V. Balagué, C. Pedros-Alio, and R. Massana.** 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:163-174.
71. **Schuchardt, B., and D. Busch.** 1991. Seasonal and spatial variations in cell numbers of attached and free-living bacteria in the inner part of the Weser estuary. *Verh. Int. Ver. Limnol.* **24**:2585-2590.
72. **Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, and R. I. Amann.** 2003. An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2928-2935.
73. **Selje, N., and M. Simon.** 2003. Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:221-237.
74. **Simek, K., P. Kojacka, J. Nedoma, P. Hartman, J. Vrba, and D. R. Dolan.** 1999. Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* **20**:1634-1644.
75. **Simek, K., J. Armengol, M. Comerma, J. C. Garcia, P. Kojacka, J. Nedoma, and J. Hejzlar.** 2001. Changes in epilimnetic bacterial community composition, production, and protist-induced mortality along the longitudinal axis of a highly eutrophic reservoir. *Microb. Ecol.* **42**:359-371.
76. **Simek, K., J. Pernthaler, M. G. Weinbauer, K. Hornak, J. R. Dolan, J. Nedoma, M. Mašín, and R. I. Amann.** 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellated grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2723-2733.
77. **Stevenson, B. S., S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt, and J. A. Breznak.** 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4748-4755.
78. **Suzuki, M. T.** 1999. Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquat. Microb. Ecol.* **20**.
79. **Thioulouse, J., D. Chessel, D. Dolédec, and J. M. Olivier.** 1997. Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comput.* **7**:75-83.
80. **Urbach, E., K. L. Vergin, L. Young, A. Morse, G. L. Larson, and S. J. Giovannoni.** 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic crater lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**:557-572.

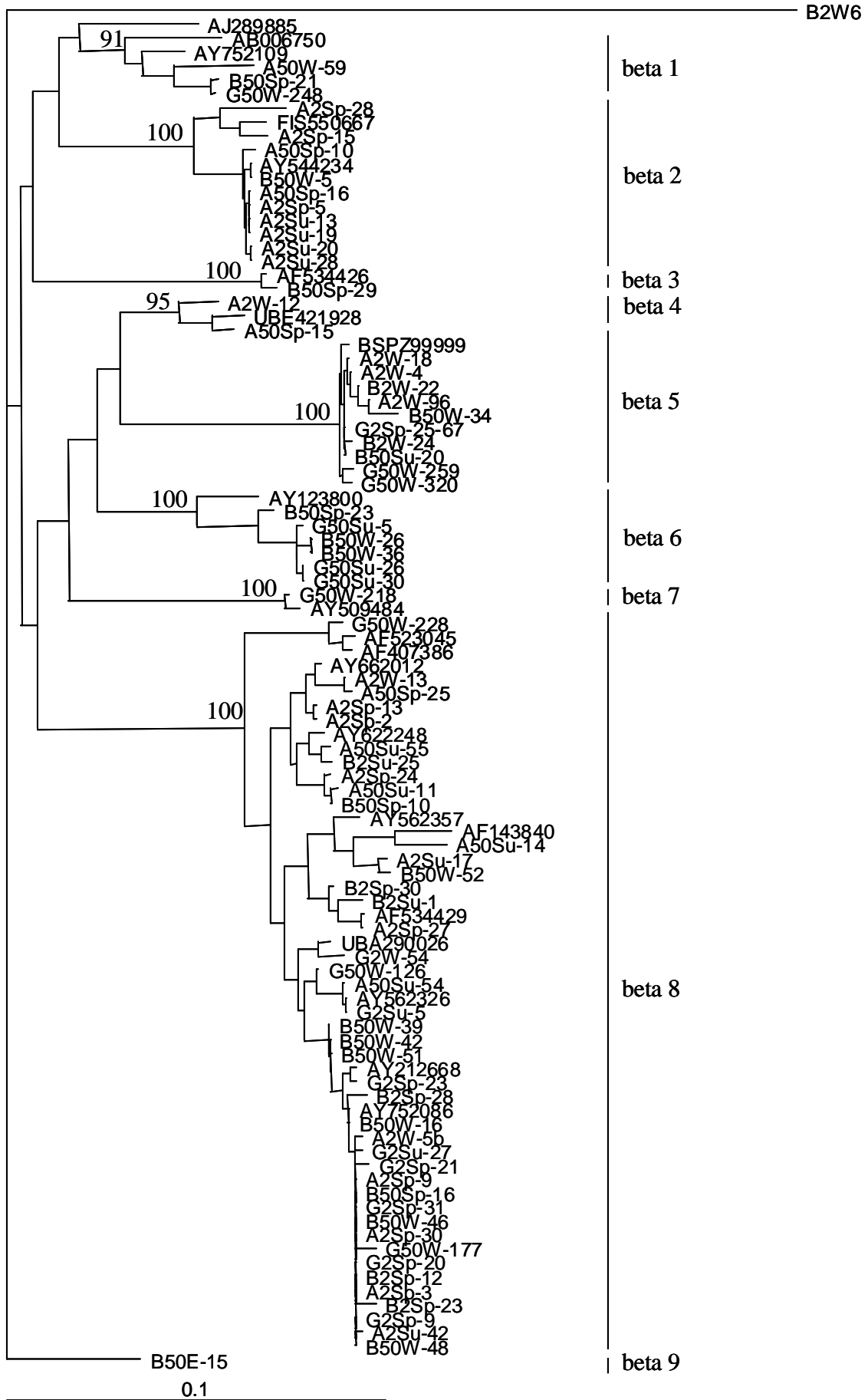
81. **Van der Gucht, K., K. Sabbe, L. De Meester, N. Vloemans, G. Zwart, M. Gillis, and W. Vyverman.** 2001. Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ. Microbiol.* **3**:680-690.
82. **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, K. Kerksters, and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**:407-438.
83. **Warnecke, F., R. I. Amann, and J. Pernthaler.** 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* **6**:242-253.
84. **Whitaker, R. J., D. W. Grogan, and J. W. Taylor.** 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**:976-978.
85. **Witman, J. D., R. J. Etter, and F. Smith.** 2004. The relationship between regional and local species diversity in marine benthic communities: a global perspective. *PNAS* **101**:15664-15669.
86. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221-271.
87. **Wommack, K. E., and R. R. Colwell.** 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:69-114.
88. **Yannarell, A. C., and E. W. Triplett.** 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:214-223.
89. **Yannarell, A. C., and E. W. Triplett.** 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:227-239.
90. **Zengler, K., G. Toledo, M. Rappé, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, and M. Keller.** 2002. Cultivating the uncultured. *PNAS* **99**:15681-15686.
91. **Zwart, G., W. D. Hiorns, B. A. Methé, M. P. van Agterveld, R. Huismans, S. C. Nold, J. P. Zehr, and H. J. Laanbroek.** 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **21**:546-556.
92. **Zwart, G., B. C. Crump, M. P. Kamst-van Agterveld, H. Ferry, and H. Suk-Kyun.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**:141-155.
93. **Zwart, G., E. J. van Hannen, M. P. Kamst-van Agterveld, K. Van der Gucht, E. S. Lindström, J. Van Wichelen, T. Lauridsen, B. C. Crump, S.-K. Han, and S.**

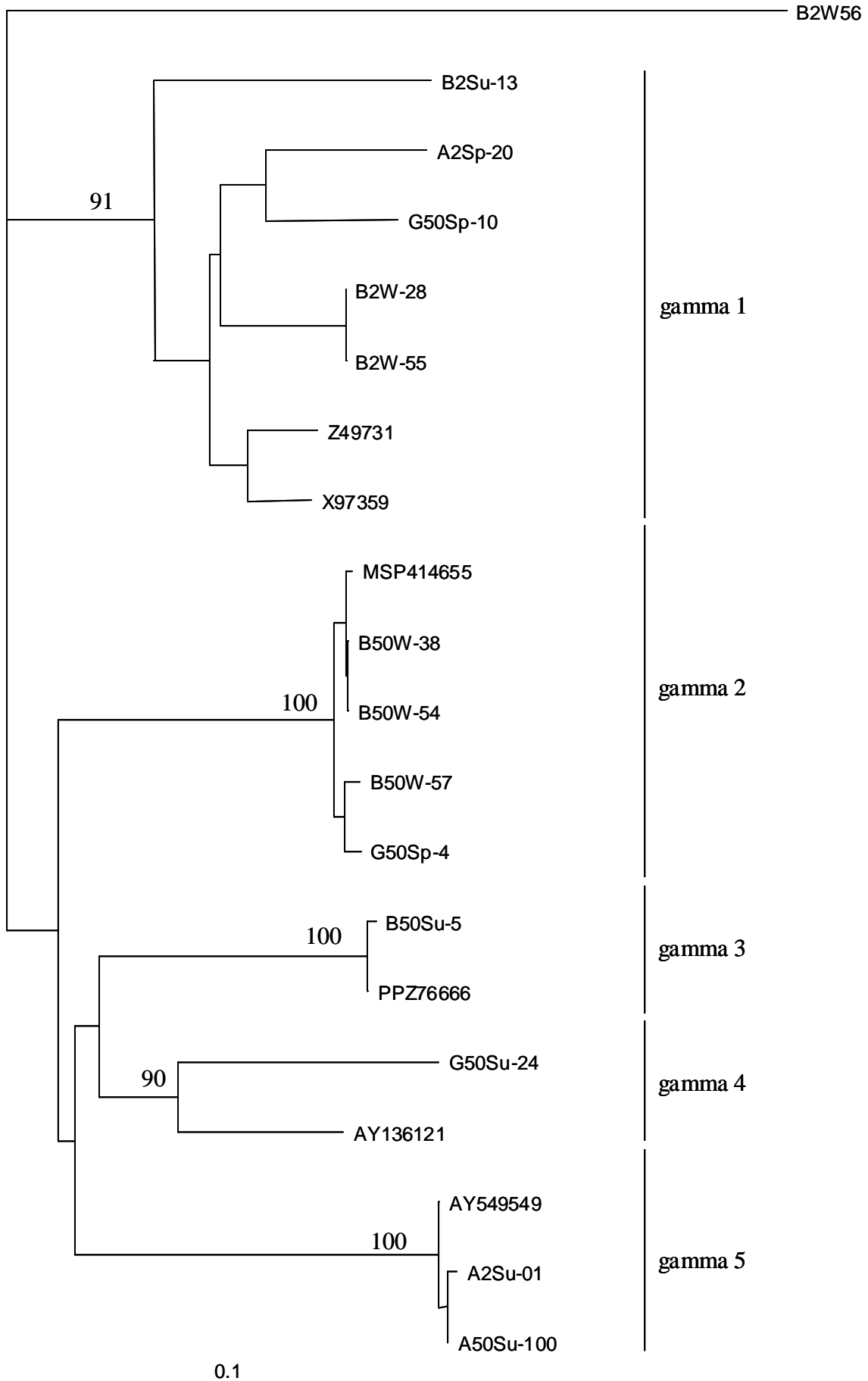


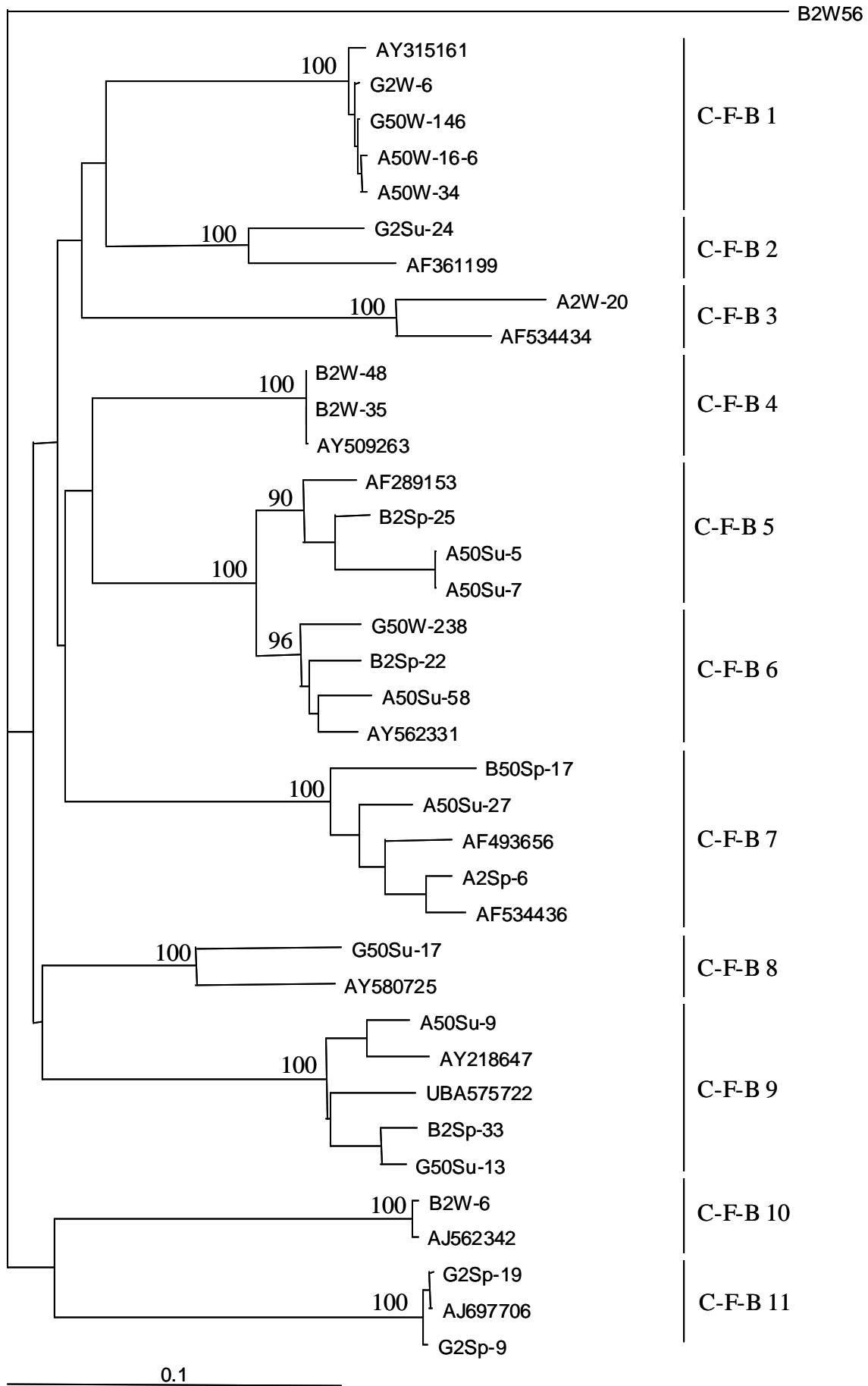
- Declerck.** 2003. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5875-5883.
94. **Zwisler, W., N. Selje, and M. Simon.** 2003. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**:211-225.

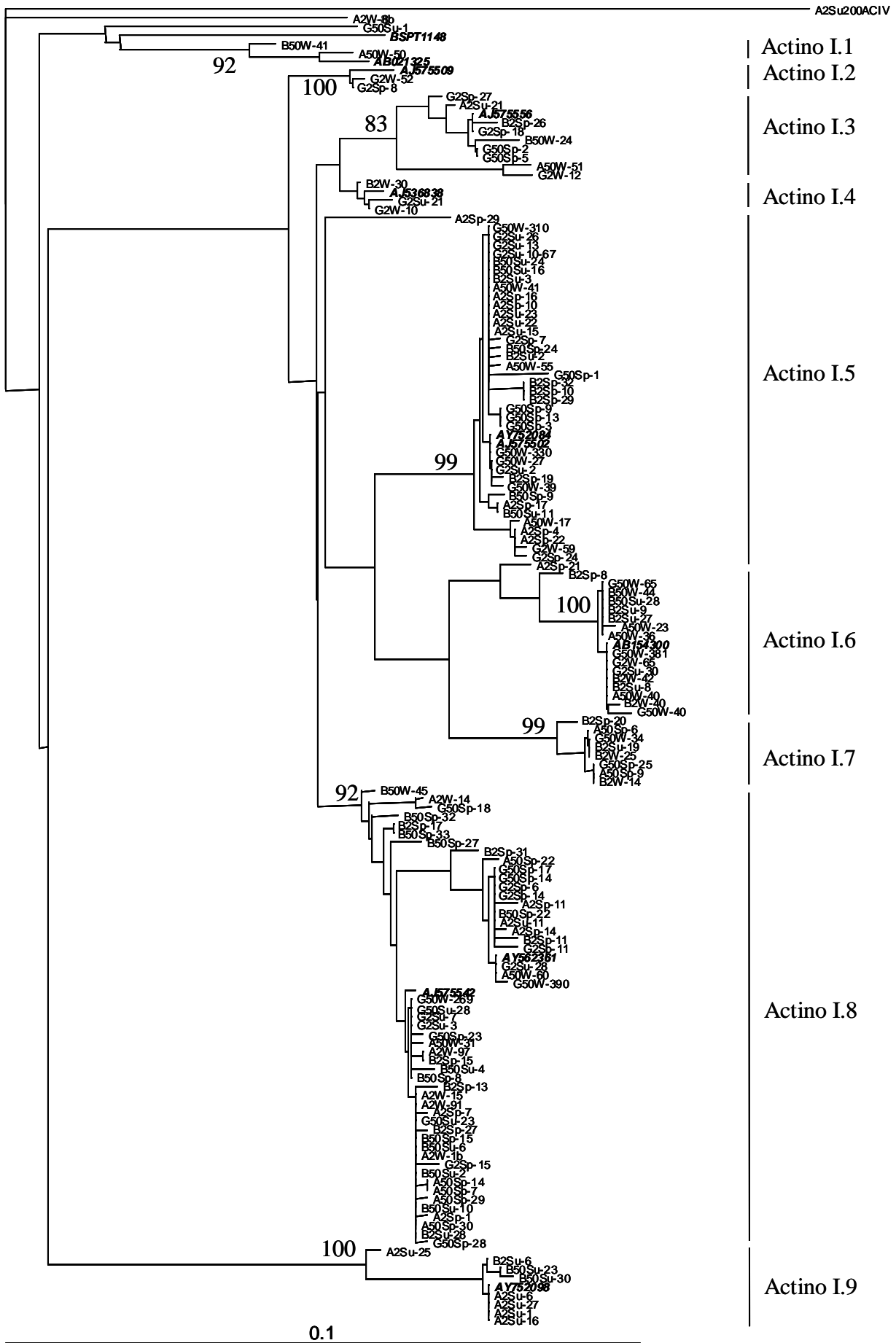
Neighbor-joining trees on the Jukes-Cantor distances the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -*Proteobacteria* subdivisions, in the *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (C-F-B) division and in the *Actinobacteria* division with subgroups I and IV. Partial 16S rRNA gene clones obtained from lakes Bourget, Annecy and Geneva, at depths of 2 and 50 m and on three sampling dates were compared to homologous sequences relative to environmental clones or cultured species (bold printed accession numbers). Clone designations: B, Bourget; A, Annecy; G, Geneva; 2, 2 m; 50, 50 m; Su, summer; W, winter, Sp, spring. The numbers correspond to the clone number within the clone library. Only bootstrap values > 80 % are indicated at the nodes of the tree (500 resamplings).



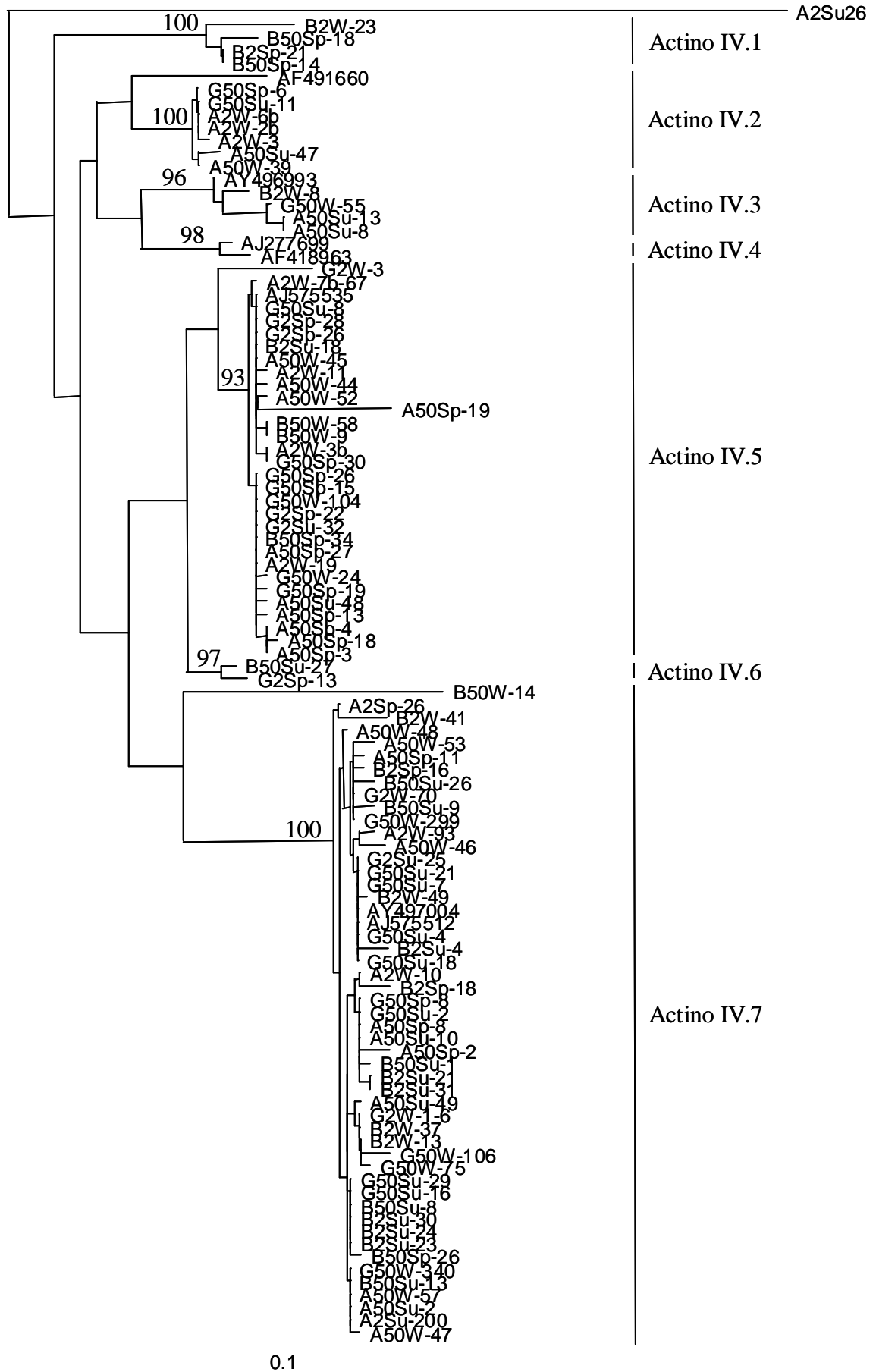








0.1







### **3. Article n° IV : Cyanophage Diversity Inferred from g20 Gene Analyses in the Largest Natural French Lake, Lake Bourget.**

#### **3.1. Contexte de l'étude**

Les virus occupent un rôle clef au sein des écosystèmes aquatiques en raison de leur abondance importante, de leur présence ubiquiste et de leur impact sur la mortalité des populations bactériennes et phytoplanctoniques (Fuhrman, 1999 ; Wilhelm et Suttle, 1999). Actuellement, très peu de données sont disponibles sur la diversité de ces microorganismes et la plupart des travaux concerne le milieu marin. A notre connaissance la diversité de cyanophages n'avaient pas encore fait objet d'investigation en milieu d'eau douce.

Compte tenu que le lac du Bourget connaît depuis plusieurs années des efflorescences d'une cyanobactérie filamenteuse toxique, *Planktothrix rubescens*, et que ce lac constitue la plus grande réserve d'eau douce en France, il nous est apparu intéressant d'établir dans un premier temps la diversité de cyanophages au sein de ce lac et ses variations saisonnières en parallèle à un suivi de la dynamique des communautés eubactériennes et cyanobactériennes.

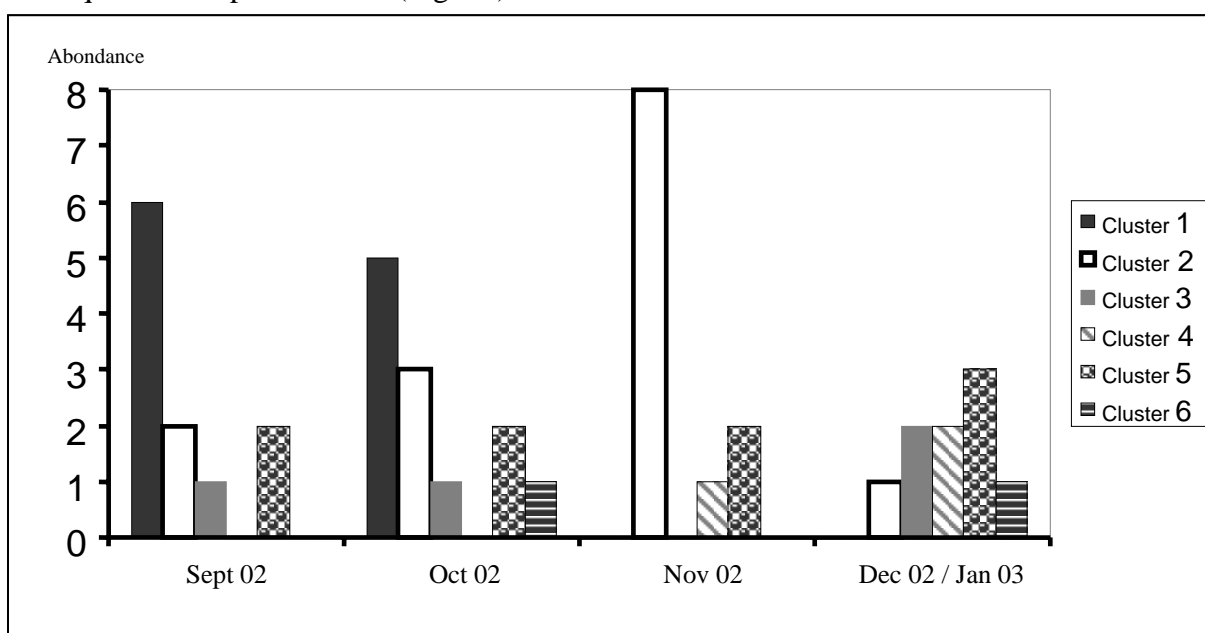
#### **3.2. L'étude réalisée**

Les échantillons d'eau ont été prélevés mensuellement de septembre 2002 jusqu'en janvier 2003 à 5 mètres de profondeur au point de référence du lac (se référer au chapitre II). Pour l'évaluation de la composition et diversité génétique, trois couples d'amorces CPS1-CPS2, CPS3-CPS4 et CPS1-CPS8 déjà utilisées en milieu marin (Fuller et al., 1998 ; Zhong et al., 2002) et ciblant un gène codant pour une protéine de la capsid virale, la protéine g20, ont été testés directement sur des prélèvements du Bourget ayant été préalablement concentrés par ultrafiltration tangentielle. Après plusieurs essais, le couple CPS1-CPS8 a été retenu. Les produits d'amplification ont ensuite fait l'objet de deux traitements : un clonage suivi d'un séquençage aléatoire dans chaque banque de clones obtenue et une séparation par électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE). En parallèle à l'estimation de la composition et diversité des cyanophages, un suivi de la dynamique des communautés virales, bactériennes, picocyanobactériennes a été effectué par cytométrie en flux de même qu'un suivi en microscopie optique de la dynamique de *P. rubescens*.

### 3.3. Composition et diversité virale

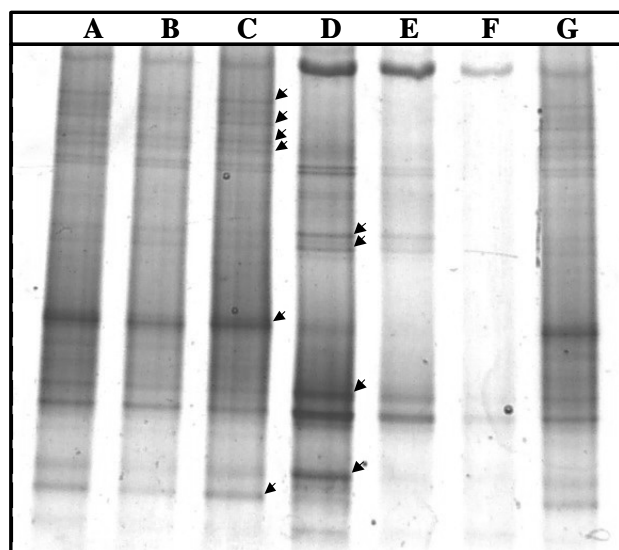
Par clonage-séquençage, 35 génotypes distincts de cyanophages ont été identifiés parmi les 47 séquences obtenues et une grande diversité a été observée aussi bien dans les séquences nucléiques que dans les séquences protéiques. Par analyse phylogénétique, il est apparu que ces séquences se regroupent en 6 clusters. Certains de ces clusters sont phylogénétiquement plus proches de séquences de cyanophages marins que des autres groupes de cyanophages du lac du Bourget.

La répartition des divers clusters au cours du temps est saisonnière. Par exemple, le cluster 1 n'est présent qu'en septembre et octobre, alors que les clusters 2 et 4 sont présents à chaque date de prélèvement (Fig. 20).



**Fig.20.** Distribution des 6 clusters de cyanophages identifiés dans le lac du Bourget en fonction des dates de prélèvements.

La technique de DGGE a pu être mise au point avec les amorces CSP1-CSP8. Les divers profils de migration confirment les changements saisonniers observés par séquençage dans la structure de la communauté de cyanophage du lac du Bourget. Ces changements interviennent principalement entre les prélèvements réalisés en octobre et ceux réalisés en novembre (Fig.21).



**Fig.21.** Profils de migration en DGGE sur les produits d'amplification obtenus en septembre (B), octobre (C), novembre (D), décembre (E), janvier (F) et dans un mélange septembre-octobre (A et G). Les flèches indiquent les modifications les plus importantes dans ces profils.

En conclusion, une grande cohérence au niveau des résultats a été observée dans les deux approches utilisées (DGGE et séquençage) pour estimer les variations saisonnières dans la composition de la communauté des cyanophages du lac du Bourget. Des relations intéressantes ont été trouvées entre ces changements dans la composition de cette communauté et les variations dans la dynamique des populations virales, bactériennes, picocyanobactériennes et cyanobactériennes (*P. rubescens*). Cette analyse montre notamment que les séquences de cyanophages obtenues semblent plus probablement provenir de cyanophages parasites de picocyanobactéries que de « microcyanobactéries » comme *P. rubescens*. Aucune relation directe ne semble en effet exister entre la dynamique de *P. rubescens* et la dynamique des particules virales de même que la composition de cette communauté.



## Cyanophage Diversity, Inferred from *g20* Gene Analyses, in the Largest Natural Lake in France, Lake Bourget

Ursula Dorigo, Stéphan Jacquet, and Jean-François Humbert\*

*Equipe de Microbiologie Aquatique, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, UMR CARTELE, 74203 Thonon Cedex, France*

Received 8 October 2003/Accepted 13 November 2003

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

During the last 2 decades, viruses have been shown to be a key component of aquatic microbial communities because of their abundance, ubiquity, and potential impact on both biogeochemical and ecological cycles through the infection and lysis of bacterial and phytoplankton communities (9, 33). Several reports concerning the impact of viral lysis on the dynamics and clonal composition of bacterial and algal host communities have been published (see, for instance, references 2, 20, 22 and 28), but in contrast little is yet known about the diversity of viral communities (e.g., reference 37). However, during the last few years, significant advances have been made in assessing the diversity of natural viral communities in marine ecosystems (3, 13, 23, 34, 37), whereas we still know relatively little about the viral diversity of freshwater ecosystems (17, 36).

The development of molecular tools and genetic techniques have made it possible to reveal the extensive viral diversity. Until recently, this parameter had been greatly underestimated by culture-dependent methods and morphological identification (5, 32). We now have methods that can target either the entire genome, such as pulsed-field gel electrophoresis (2, 12, 37), total community DNA-DNA hybridization (32), and restriction digestion (3, 17, 34), or single genes, such as cloning and sequencing methods (to create clone libraries) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (19, 25). However, microbiologists attempting to study viral diversity from single genes still face a major problem: there is no “universal target,” such as the rRNA genes, that occurs in both bacteria and eukaryotic microorganisms (24).

In the general context of our attempts to assess the diversity and functioning of pelagic microbial communities in the three great subalpine lakes (lakes Annecy, Bourget, and Geneva), it is very important to be able to evaluate the diversity and

dynamics of viruses, especially the cyanophages. Freshwater cyanobacteria play a key role within the phytoplanktonic community in these ecosystems, and we want to know what contribution viruses make to cyanobacterial structure and dynamics and their role in control and mortality during and following bloom episodes. Picocyanobacteria such as *Synechococcus* spp. dominate the phytoplankton community biomass in Lake Annecy (oligotrophic), whereas large, filamentous, toxin-producing cyanobacteria such as *Planktothrix rubescens* can be predominant during much of the year in the mesotrophic lakes Bourget and Geneva (16; S. Jacquet, unpublished data).

In this study, we tested the CSP1-CSP8 cyanophage primers targeting the *g20* gene encoding the viral capsid structure, previously defined by Zhong et al. (39) for marine viruses, in surface water samples from Lake Bourget, and we subsequently characterized the cyanophage diversity by both cloning-sequencing and DGGE. The abundance of viruses, heterotrophic bacteria, picocyanobacteria, and *Planktothrix rubescens* was also assessed by flow cytometry or microscopic counting. All of these determinations were performed once or twice a month between September 2002 and January 2003.

### MATERIALS AND METHODS

**Site description, sampling strategy, and cyanophage isolation.** A complete description of Lake Bourget, which is the largest natural lake in France, has been provided elsewhere (S. Jacquet, J.-F. Briand, C. Leboulanger, G. Paolini, L. Oberhaus, B. Tassin, B. Vinçon-Leite, J.-C. Druart, O. Anneville, and J.-F. Humbert, submitted for publication). Lake water was collected at a depth of approximately 5 m at the reference station located in the middle and deepest part of the lake once a month from September 2002 to January 2003. Twenty liters of lake water was sampled by using an electric pump on a boat deck and kept in a plastic flask while being transported to the laboratory. The water samples were kept at 4°C in the dark for no more than 1 week before being processed. The water was filtered through GF/F filters in order to remove both phyto- and zooplankton. The resulting filtrate was then concentrated at least 100-fold by tangential flow filtration using a mini-ultrasette with a 100-kDa cutoff membrane (Vivaflow; Vivasciences). The concentrate was stored at 4°C until PCR amplification, since phage communities can be stored in these conditions for days to months without significant loss of titer (S. Jacquet, unpublished data, and K. Rodda and C. A. Suttle, unpublished data).

\* Corresponding author. Mailing address: UMR CARTELE, Station INRA d'Hydrobiologie Lacustre, Equipe de Microbiologie Aquatique, BP 511, 74203 Thonon Cedex, France. Phone: 33-4-50-26-78-09. Fax: 33-4-50-26-78-06. E-mail: humbert@thonon.inra.fr.

**Flow cytometry analyses.** Samples were analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer equipped with a blue laser beam fixed at 488 nm and with the original filter set up. Picocyanobacteria were analyzed without any fixative or dye, and the community was identified on the basis of its chlorophyll and phycoerythrin fluorescences and the right-angle light scatter. To count the heterotrophic bacteria and viruses, samples underwent preliminary fixing with glutaraldehyde (0.25% final concentration) for 30 min in dim-light conditions and were then filtered through 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size filters. For the analysis of heterotrophic bacteria, samples were diluted 50-fold with water from the lake sampled the same day and subjected to filtration with 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size filters. For the analysis of viruses, the samples were diluted 100-fold in Tris-EDTA buffer (filtered through 0.02- $\mu\text{m}$ -pore-size filters; pH = 7.8) and heated to 75°C for 10 min. Samples of these two communities were stained by using the nucleic acid dye SYBR Green I (see reference 18 for more details). Cellular parameters were determined relative to the values found for 1- $\mu\text{m}$  beads (Molecular Probes). Data were collected in listmode files and then analyzed using CYTOWIN software (30) (available at <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html>).

**Counting of *P. rubescens*.** At each sampling date, 300 ml of water was preserved with Lugol's iodine solution for subsequent microscopic counts. Two-hundred-micrometer units of *P. rubescens* filaments were counted using the Utermöhl inverted microscope technique after sedimenting 25 to 50 ml of water. The number of cells was estimated by assuming that the mean length of a *P. rubescens* cell (estimated from 100 measurements) was 5  $\mu\text{m}$ .

**PCR amplification, cloning, and sequencing.** All PCRs were performed using a T-Personal DNA thermal cycler (Biometra). Three pairs of oligonucleotides (CPS1-CPS2, CPS3-CPS4, and CSP1-CSP8 [10, 39]) were initially tested to amplify overlapping regions of the *g20* gene of cyanophages belonging to the family *Myoviridae* (17, 19). After several attempts (results not shown), we chose CPS1-CPS8, as the first pair led to nonspecific amplification and the second pair led to sequences that were too short for phylogenetic analyses. The 25- $\mu\text{l}$  reaction mix contained 10 $\times$  *Taq* reaction buffer (Eurobio), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  concentrations of each deoxynucleoside triphosphate, 1  $\mu\text{M}$  concentrations of each primer (CPS1 and CPS8), 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Eurobio), and 10  $\mu\text{l}$  of the viral concentrate. For each set of reactions, a negative control sample was included that contained all of the reagents but without the viral DNA. PCRs were carried out as described by Zhong et al. (39), with the exception of the annealing temperature, which was higher (46°C) than that used previously. PCR products (13  $\mu\text{l}$ ) were subjected to electrophoresis on a 1.4% (wt/vol) agarose gel.

Positive PCR products were ligated to the pGEM-T System II vector (Promega) and then transformed into JM109-competent cells (Promega) according to the manufacturer's instructions. At least 15 positive clones (white colonies) from each clone library were randomly selected, and plasmid DNA was isolated by PCR, using the commercial primers SP6 and T7, and then sequenced (6).

**Phylogenetic analyses.** The sequences were aligned using the Pileup module of the GCG package (Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wis.), and alignment was manually corrected using GeneDoc. A phylogenetic tree was constructed for the whole data set by neighbor joining on the Jukes-Cantor distances by using the PHYLIP software package (7). The bootstrap option was used to run 1,000 replicates. Several operational taxonomic units (OTUs) were defined on the basis of their bootstrap proportions. The Chao-1 and abundance-based coverage estimators of species richness (15) were calculated using EstimateS software (<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>), and a rarefaction curve was obtained using PAST software (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

**DGGE analysis.** For the DGGE analysis, the CPS1 primer was altered by adding a 40-nucleotide GC-rich sequence (GC clamp) to the 5' end and hence renamed CPS1GC. The sequence was as follows: 5' CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-GTAG[T/A]ATTTTCTACAT TGA[C/T]GTTGG 3'. The 50- $\mu\text{l}$  reaction mix for PCR-DGGE contained 10 $\times$  *Taq* reaction buffer (Eurobio), 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  concentrations of each deoxynucleoside triphosphate, 1  $\mu\text{M}$  concentrations of each primer (CPS1GC and CPS8), 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Eurobio), and 20  $\mu\text{l}$  of viral lysate. The same PCR and electrophoresis conditions as described above were used.

DGGE analysis was performed using the CBS-DGGE 2000 system (C.B.S. Scientific Co., Inc.). PCR products (40  $\mu\text{l}$ ) were loaded onto a 1-mm-thick 6% polyacrylamide gel in 1 $\times$  TAE (40 mM Tris acetate [pH 7.4], 20 mM sodium acetate, 1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ) which contained a 30 to 70% linear denaturing gradient (100% is defined as 7 M urea plus 40% deionized formamide), as previously established for perpendicular DGGE (data not shown). Electrophoresis was performed at a constant voltage of 100 V and a temperature of 60°C for the optimal duration of 16 h (data not shown). Separated PCR products were stained for 45 min in the dark with SybrGold (Molecular Probes), visualized on

a UV transilluminator (Tex-35 M; Bioblock Scientific), and photographed with a Kodak DC290 camera.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The *g20* nucleotide sequences have been deposited in the GenBank-EMBL database under accession numbers AY426128 to AY426174.

## RESULTS

**Dynamics of microbial communities.** The dynamics of viruses, heterotrophic bacteria, and cyanobacteria (both picocyanobacteria and *P. rubescens*) in Lake Bourget were monitored in the autumn and early winter of 2002-2003. During this period, we observed a net decrease in the cell (or particle) abundance of picocyanobacteria, heterotrophic bacteria, and viruses, whereas the cell density of *P. rubescens* rose (Fig. 1). There was a clear decline in the density of the viral community throughout the period of interest (from  $26 \times 10^7$  to  $5.8 \times 10^7$  parts/ml), apart from an isolated peak in October (Fig. 1A). The abundance of the heterotrophic bacteria was halved during the period studied, but the dynamics of this community was characterized by a succession of alternating decreasing and increasing phases until January 2003 (Fig. 1B). For picocyanobacteria, there was an initial decrease in cell density from  $2.1 \times 10^5$  to  $3.0 \times 10^4$  cells  $\text{ml}^{-1}$  in September, followed by a stationary phase until the end of October and then by a second decrease in November (Fig. 1C). Finally, the abundance of *P. rubescens* rose almost 10-fold from September to November and then decreased slowly (Fig. 1D). Viral abundance was positively correlated with that of heterotrophic bacteria ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.05$ ) and that of picocyanobacteria ( $r = 0.77$ ;  $P < 0.01$ ). In contrast, there was no correlation between the abundance of viruses and that of *P. rubescens* ( $r = -0.50$ ; not significant).

**Analysis of nucleotide *g20* sequences.** Among the 47 sequences obtained by random sequencing in the different clones libraries, 12, 13, 12, 6, and 4 were obtained from samples taken on September 26, October 28, November 27, December 23, and January 28, respectively. On the two last dates, only a few sequences were obtained due to a low cloning efficiency (low number of white colonies); this was linked to the low PCR efficiency (data not shown). Consequently, the sequences obtained on these last two dates were pooled in the subsequent analyses. The 47 sequences included 35 different haplotypes. The total nucleotide diversity was not significantly different for the four sampling periods: 0.29 ( $\pm 0.15$ ) in September, 0.32 ( $\pm 0.16$ ) in October, 0.22 ( $\pm 0.12$ ) in November, and 0.34 ( $\pm 0.18$ ) in December and January.

**Phylogenetic analyses of *g20* sequences.** Phylogenetic analysis revealed the existence of six clearly distinguished clusters containing 11, 14, 4, 3, 12, and 2 sequences, respectively (Fig. 2). In each of these clusters, the percentage of nucleotide sequence similarity between cyanophage sequences was always >96%. On the other hand, the similarity ranged between 54 and 60% when sequences belonging to different clusters were compared. All of these clusters were highly supported by their bootstrap proportion (1,000 resamplings). One sequence ("Seq. 1" in Fig. 2) stood apart from all of these clusters. Thus, a total of seven OTUs were identified in this study. Both the Chao-1 and abundance-based coverage richness estimators were equal to  $7 \pm 1$  (standard deviation), which means that we obtained a good estimation of the OTU richness in the cy-

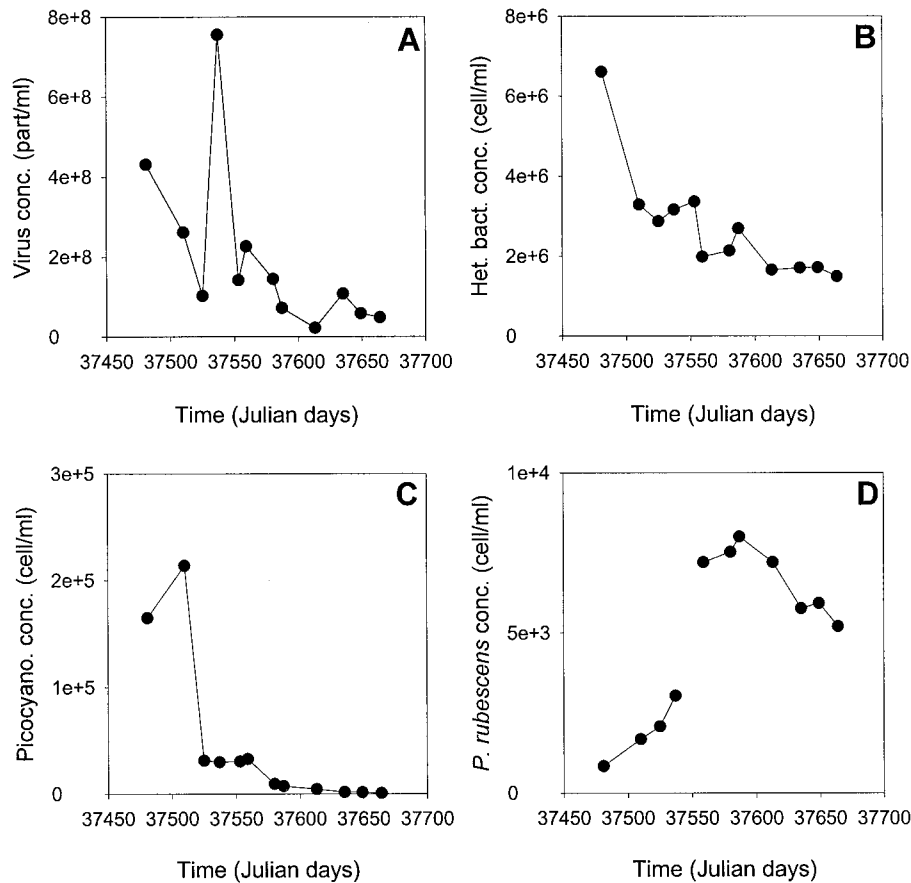


FIG. 1. Temporal changes in the dynamics of viral (A), heterotrophic bacterial (B), picocyanobacterial (C), and *P. rubescens* (D) communities in Lake Bourget.

nophage community of Lake Bourget. Similarly, the asymptotic rarefaction curve (data not shown) confirmed the representative nature of our sequence sample.

The phylogenetic distances between these freshwater cyanophage sequence clusters were of the same order as those found when they were compared to marine cyanophage sequences (Fig. 2). Interestingly, the sequences in some of our freshwater cyanophage clusters (clusters 2 and 4) were genetically more similar to some marine cyanophage sequences than to the other clusters defined in this study. For example, there was 73 to 74% nucleotide sequence similarity between cluster 4 sequences and marine cyanophage sequences, ay152732, ay152738, and ay152741, but less than 60% similarity with other freshwater cyanophage sequences.

**Temporal variation in the cyanophage community.** The distribution of the sequences belonging to the different clusters determined above (Fig. 3) revealed first that sequences belonging to cluster 1 were only obtained in September and October. Moreover, it appears that these sampling months were characterized by very similar patterns for the sequence distributions, distinguished by the dominance of cluster 1 sequences, but also by the presence of cluster 2, 3, and 5 sequences. November was characterized by a high dominance of sequences belonging to cluster 2 (Fig. 3). For December and January, sequences belonging to five of the six clusters were found in quite similar proportions (Fig. 3). Only two clusters

(clusters 2 and 5) were found throughout the whole season. The first (cluster 2) showed high variations in regard to the sampling months, while for the second (cluster 5), no variation was observed.

**DGGE analysis.** DGGE analysis was performed on the same samples as those used for the sequencing approach. On the one hand, the study of the DGGE migration profile (Fig. 4) revealed that the first two sampling months (September and October) were characterized by similar band patterns. On the other hand, considerable differences in the band intensities were observed in the migration profile obtained for the November sample (Fig. 4). During the last two sampling months (December and January), there was a low intensity in the profiles due to a low PCR amplification efficiency. It seems, however, that these patterns were more similar to that obtained for the November sample than to those for the September and October samples (Fig. 4).

## DISCUSSION

Our findings show that the phylogenetic diversity of natural cyanophages in the mesotrophic Lake Bourget seems to be very great. Seven OTUs were identified among the 47 sequences obtained over a limited period of time (6 months in 2002-2003). This relatively high diversity of the cyanophage community has already been reported, but as far as we are



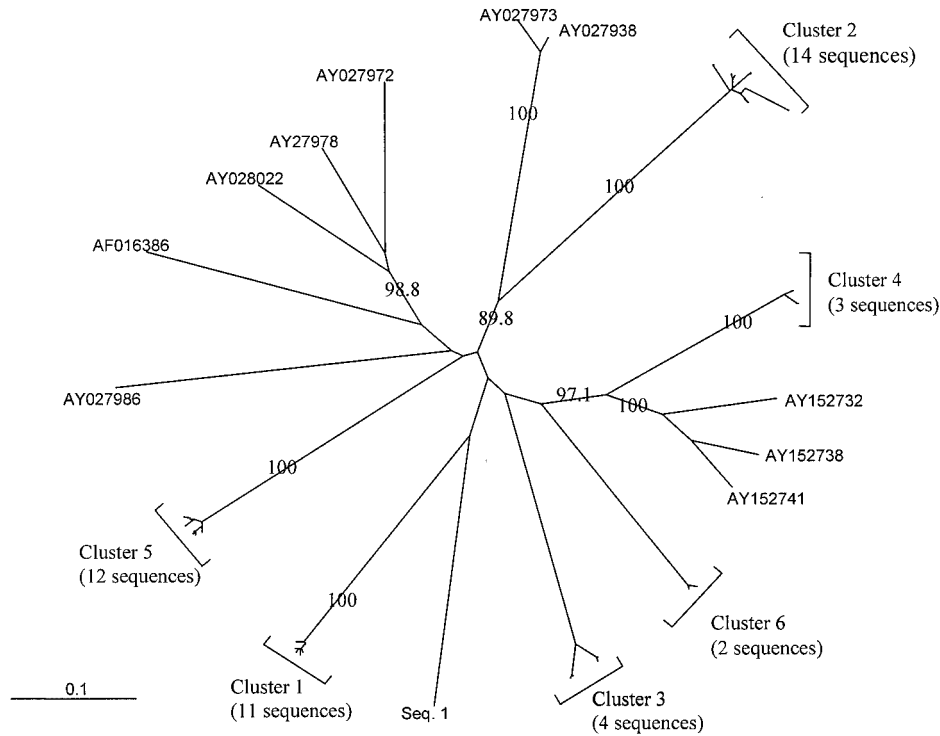


FIG. 2. Phylogenetic relationships among the partial *g20* gene sequences from the cyanophage community of Lake Bourget. The unrooted tree was constructed from pairwise Jukes and Cantor distances by using the neighbor-joining method. Marine cyanophage sequences, identified by their GenBank accession numbers, were also added. Only bootstrap values of >80% are indicated at the nodes of the tree.

aware, it has only been shown in marine ecosystems (19, 39). Zhong et al. (39) and Sullivan et al. (26) proposed that this could be due to important genetic exchanges between phage and host or between coinfecting phages. Another complementary hypothesis is that the high diversity within the cyanophage community may be linked to high diversity in the host community. In their study of picocyanobacteria from oligo- and mesotrophic lakes, Becker et al. (1) found that different lineages of the picoplankton clade sensu Urbach et al. (29) were present

in Lake Constance (Germany), an ecosystem which has physical, chemical, and biological characteristics very similar to those of Lake Bourget. Following the same approach, Crosbie et al. (4) recently showed that there are at least seven clusters within nonmarine picocyanobacteria. Despite its partial nature, our study of the molecular characteristics of freshwater cyanophages suggests once again that genetic diversity may be high within this community.

The genetic distances we found between the different clus-

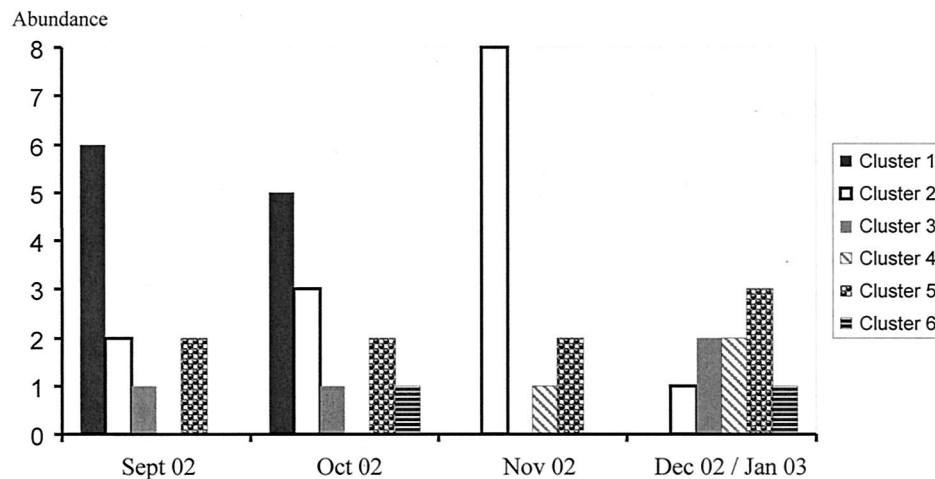


FIG. 3. Temporal changes in the abundance of the six clusters defined by the phylogenetic analysis of the *g20* gene sequences from the cyanophage community of Lake Bourget.

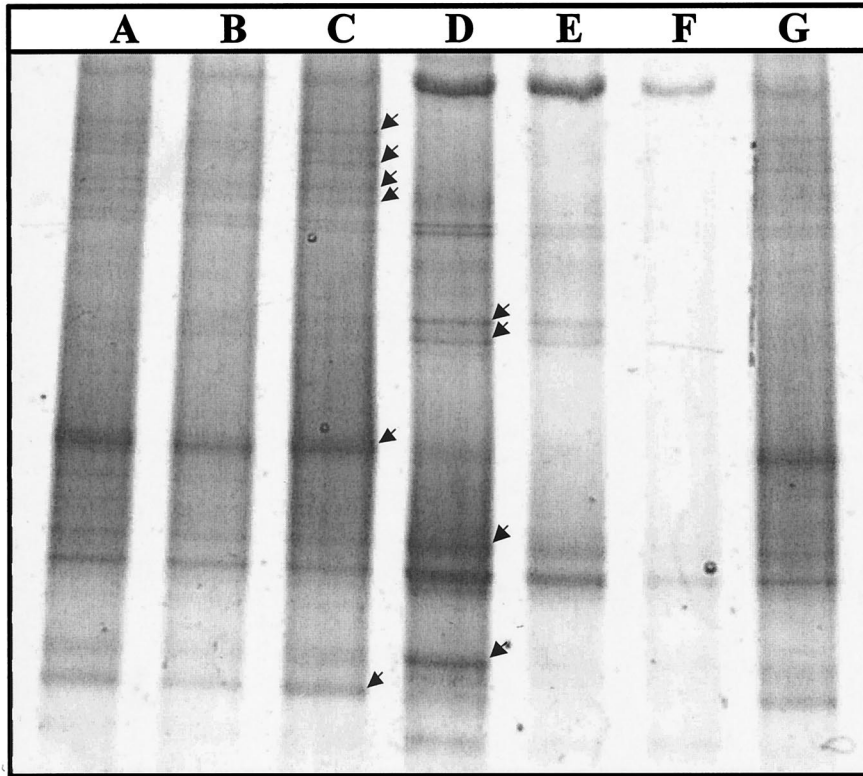


FIG. 4. Temporal changes in the DGGE band patterns obtained for PCR products resulting from the amplification of a 592-bp fragment of the *g20* gene in the cyanophage community of Lake Bourget. Arrows indicate the principal differences between the September-October and November band patterns. Lanes: A and G, mix of September-October samples; B, September sample; C, October sample; D, November sample; E, December sample; F, January sample.

ters were in the same range as those found by Zhong et al. (39) for isolates and natural marine cyanophages. Very interestingly, we found that some of our freshwater cyanophage sequences were more similar to marine cyanophage sequences than to other freshwater cyanophage sequences (Fig. 2). This finding suggests that some marine and freshwater cyanophages may have shared a common ancestor. This finding is also consistent with the fact that a close phylogenetic relationship can be found between several marine and freshwater strains of *Synechococcus* spp. (14).

Seasonal changes recorded in the (cyano)phage community sampled in surface waters of Lake Bourget affected both the abundance and the diversity of these microorganisms. As mentioned above, we observed a clear reduction in the total viral abundance from September to January and, at the same time, a decrease in PCR efficiency for the *g20* gene. This probably reflected a decrease in the target number and thus in cyanomyophage abundance. Many authors have reported a winter decrease of this sort in the viral abundance in aquatic ecosystems, and this has been attributed to a positive correlation between host and virioplankton abundance (see the review by Wommack and Colwell [38]). In our study, virioplankton abundance was indeed positively correlated with that of the picobacteria (both auto- and heterotrophs). In contrast, there was no clear relationship between the viral community and the filamentous cyanobacterium *P. rubescens*, even though the concentration of the latter was relatively high. This finding

suggests that our sequences are likely to belong only to picocyanobacterial phages and/or that important resistance mechanisms exist for filamentous cyanobacteria, such as *P. rubescens*, of which major blooms without extinction episodes have been recorded (S. Jacquet et al., submitted). Such host resistance has often been reported for other cyanobacterial species (27, 31).

With regard to the seasonal pattern of *g20* phylogenetic diversity, sequencing and DGGE approaches revealed similar values in September and October, which at first sight validates both methodological approaches. Such seasonal changes in the relative cyanophage *g20* genotypes were also reported by Marston and Sallee (19) in coastal cyanophage communities and by Wommack et al. (37) in the composition of natural virioplankton communities in Chesapeake Bay. It would have been very interesting to evaluate changes in the composition of the host communities as well in order to determine the relationships between host and virus compositions. This is one of the prospects for future research arising from this study.

From a practical point of view, this study confirmed that the DGGE fingerprinting technique is a very efficient tool for monitoring changes in the composition of natural cyanophage communities. This had previously been reported in marine cyanophage communities through the use of another set of primers by Frederickson et al. (8) and by Wilson et al. (35). Combined with quantitative PCR, it may make it possible to assess the relative abundance of the various strains in these

communities. Indeed, this approach is now presently used in clinical virology (e.g., see references 11 and 21), and its application to aquatic viral ecology could be extremely promising.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to F. Chen (University of Maryland Biotechnology Institute, Baltimore) for his valuable advice about the PCR conditions for *g20* gene amplification. Monika Ghosh is acknowledged for improving the English version of the manuscript.

The DGGE system was funded by la Fondation pour la Recherche Médicale. The flow cytometer was funded by l'Institut National de la Recherche Agronomique and l'Université de Savoie.

#### REFERENCES

1. Becker, S., M. Fahrbach, P. Böger, and A. Ernst. 2002. Quantitative tracing, by *Taq* nuclease assays, of a *Synechococcus* ecotype in a highly diversified natural population. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4486–4494.
2. Castberg, T., A. Larsen, R. A. Sandaa, C. P. D. Brussaard, J. K. Egge, M. Heldal, R. Thyrraug, E. J. van Hannen, and G. Bratbak. 2001. Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (*Haptophyta*). *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **221**:39–46.
3. Chen, F., C. A. Suttle, and S. M. Short. 1996. Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2869–2874.
4. Crosbie, N. D., M. Pöckl, and T. Weisse. 2003. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpbA*-intergenic spacer sequences analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5716–5721.
5. Demuth, J., H. Neve, and K. P. Witzel. 1993. Direct electron microscopic study on the morphological diversity of bacteriophage populations in Lake Plußsee. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3378–3384.
6. Dorigo, U., A. Bérard, and J. F. Humbert. 2002. Comparison of eukaryotic phyto-benthic community diversity in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microb. Ecol.* **4**:372–380.
7. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5 c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
8. Frederickson, C. M., S. M. Short, and C. A. Suttle. 17 September 2003. The physical environment affects cyanophage communities in British Columbia inlets. *Microb. Ecol.* [Online.]
9. Fuhrman, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**:541–548.
10. Fuller, N. J., W. H. Wilson, I. Joint, and N. H. Mann. 1998. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 *g20* and its application to PCR-based detection and quantification techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2051–2060.
11. Goldberg, T. L., D. A. Coleman, E. C. Grant, K. R. Inendino, and D. P. Philipp. 2003. Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. *J. Virol.* **77**:8812–8818.
12. Hambly, E., F. Tétart, C. Desplats, W. H. Wilson, H. H. Krisch, and N. H. Mann. 2001. A conserved genetic module that encodes the major virion components in both the coliphage T4 and the marine cyanophage S-PM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:11411–11416.
13. Hennes, K. P., and M. Simon. 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:333–340.
14. Honda, D., A. Yokota, and J. Sugiyama. 1999. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Evol.* **48**:723–739.
15. Hughes, J. B., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. M. Bohannon. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4399–4406.
16. Leboulangier, C., U. Dorigo, S. Jacquet, B. Le Berre, G. Paolini, and J. F. Humbert. 2002. Use of a submersible spectrofluorometer (FluoroProbe) for the survey of a toxic cyanobacteria, *Planktothrix rubescens*, in a large alpine lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**:83–89.
17. Lu, J., F. Chen, and E. R. Hodson. 2001. Distribution, isolation, host specificity, and diversity of cyanophages infecting marine *Synechococcus* spp. in river estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3285–3290.
18. Marie, D., C. Brussaard, F. Partensky, and D. Vaulot. 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses, p. 11.11.1–11.11.15. In J. P. Robinson et al. (ed.), *Current protocols in cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
19. Marston, M. F., and J. L. Sallee. 2003. Genetic diversity and temporal variation in the cyanophage community infesting marine *Synechococcus* species in Rhode Island's coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4639–4647.
20. Nagasaki, K., K. Tarutani, and M. Yamaguchi. 1999. Cluster analysis on algal activity of HaV clones and virus sensitivity of *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *J. Plankton Res.* **21**:2219–2226.
21. Niesters, G. M. 2002. Clinical virology in real time. *J. Clin. Virol.* **25**:S3–S12.
22. Noble, R., M. Middelboe, and J. A. Fuhrman. 1999. Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* **18**:1–13.
23. Paul, J. H., M. B. Sullivan, A. M. Segall, and F. Rohwer. 2002. Marine phage genomics. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **133**:463–476.
24. Rohwer, F., and R. Edwards. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* **184**:4529–4535.
25. Short, S. M., and C. A. Suttle. 1999. Use of the polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis to study diversity in natural virus communities. *Hydrobiologia* **401**:19–32.
26. Sullivan, M. B., J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm. 2003. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* **424**:1047–1051.
27. Suttle, C. A. 2000. Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria, p. 563–589. In B. A. Whitton and M. Potts (ed.), *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
28. Tarutani, K., K. Nagasaki, and M. Yamaguchi. 2000. Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4916–4920.
29. Urbach, E., D. J. Scanlan, D. L. Distel, J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm. 1998. Rapid diversification of marine picoplankton with dissimilar light harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (cyanobacteria). *J. Mol. Evol.* **46**:188–201.
30. Vaulot, D. 1989. CytoPC: processing software for flow cytometric data. *Signal Noise* **2**:8.
31. Waterbury, J. B., and F. W. Valois. 1993. Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3393–3399.
32. Wichels, A., S. S. Biel, H. R. Gelderblom, T. Brinkhoff, G. Muyzer, and C. Schütt. 1998. Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4128–4133.
33. Wilhelm, S. W., and C. A. Suttle. 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience* **49**:781–788.
34. Wilson, W. H., I. Joint, N. G. Carr, and N. H. Mann. 1993. Isolation and molecular characterization of five marine cyanophages propagated on *Synechococcus* sp. strain WH7803. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3736–3743.
35. Wilson, W. H., N. J. Fuller, I. Joint, and N. H. Mann. 1999. Analysis of cyanophage diversity and population structure in a south-north transect of the Atlantic ocean. *Bull. Inst. Oceanogr. (Monaco)*. **19**:209–216.
36. Wolf, A., J. Wiese, G. Jost and K.-P. Witzel. 2003. Wide geographic distribution of bacteriophages that lyse the same indigenous freshwater isolate (*Sphingomonas* sp. strain B18). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2395–2398.
37. Wommack, K. E., J. Ravel, R. T. Hill, J. Chun, and R. R. Colwell. 1999. Population dynamics of Chesapeake Bay virioplankton: total-community analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:231–240.
38. Wommack, K. E., and R. R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:69–114.
39. Zhong, Y., F. Chen, S. W. Wilhelm, L. Poorvin, and R. E. Hodson. 2002. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene *g20*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1576–1584.

## -CHAPITRE IV- DISCUSSION GENERALE

Les résultats des trois études expérimentales exposées dans le chapitre précédant ont apporté des réponses aux deux questions majeures que nous nous sommes posées dans le cadre de ce travail de thèse. La première se rapportait à l'évaluation de la variabilité spatiale et temporelle de la composition eubactérienne dans un grand lac et donc à la représentativité d'un échantillon au sein d'un tel écosystème. La seconde concernait la composition de la communauté eubactérienne et la diversité et composition de la communauté de cyanophages dans différents systèmes lacustres et l'identification des facteurs susceptibles de structurer cette diversité.

### **1. Variabilité spatiale de la composition eubactérienne pélagique dans les écosystèmes lacustres étudiés**

Les résultats issus de l'étude décrite dans l'**article II** ont fourni des informations très intéressantes concernant la variabilité spatiale de la composition de la communauté eubactérienne libre ( $< 2 \mu\text{m}$ ) et pélagique au sein d'un grand lac. Auparavant, nos connaissances se limitaient principalement à la variabilité de la diversité micro- et macroscopique au sein des écosystèmes terrestres (Ranjard et Richaume, 2001; Nunan et al., 2002 ; Ranjard et al., 2003) ou à la variabilité verticale de la diversité en milieu aquatique. Ceci est probablement dû au fait que les premières études concernaient les milieux marins, notamment les océans ouverts, et que ces études montraient des différences quant à la diversité bactérioplanctonique le long de la colonne d'eau, et au contraire, une ressemblance remarquable de la diversité bactérioplanctonique sur une très large échelle horizontale (Lee et Fuhrman, 1991 ; Hofle et Brettar, 1995 ; Acinas et al., 1997 ; Murray et al., 1998 ; Riemann et al., 1999). D'autres études ont montré plus tard que les eaux côtières de surface hébergent en général des communautés différentes par rapport à celle des océans ouverts (Rappé et al., 1997). Au sein des eaux côtières, la diversité de ces communautés peut être soit homogène sur une grande distance horizontale, soit influencée de façon significative par les arrivées d'eau

continentale, ou par la topographie de la croûte continentale qui peut avoir des conséquences sur l'hydrographie (Schauer et al., 2000).

Quant aux milieux lacustres, un certain nombre d'auteurs ont mis en évidence une forte variabilité spatiale de la diversité bactérioplanctonique en période de stratification de la colonne d'eau. En général, la variabilité est couche-dépendante. Cela a été montré par Øvreås et al. (1997) en utilisant la DGGE dans un lac méromictique permanent (lac Sælenvannet, Norvège) caractérisé par la présence d'une couche oxique, d'une chémocline et d'une couche anoxique. Plus tard, Dominik et Höfle (2002) ont confirmé ce précédant résultat en observant des communautés bactérioplanctoniques différentes selon la couche d'eau. En effectuant des analyses au printemps (début de stratification) et en été (stabilisation de la stratification), cette étude a également mis en évidence que plus la stratification était stable, plus grande était la différence observée entre les différents types de communautés. En milieu lacustre, la variabilité horizontale de la diversité bactérioplanctonique a reçu très peu d'attention. Quelques rares études, comme celle récente de Yannarell et Triplett (2004) se sont intéressées à la variabilité de la diversité bactérienne dans un ensemble de 13 lacs relativement petits du Wisconsin. Néanmoins, le nombre assez limité d'échantillons analysés par lac limitait la portée des informations obtenues.

Nous avons donc choisi d'analyser la composition eubactérienne sur une échelle spatiale horizontale et verticale par DGGE dans un écosystème lacustre de grande taille (le lac du Bourget) et à deux moments importants de l'année : en hiver pendant le brassage des eaux et en début d'été lors de la stratification de la colonne d'eau.

En hiver, sur l'ensemble de 49 échantillons prélevés, 44 avaient le même profil de DGGE (appelé dorénavant le « profil d'hiver commun »), et seuls 5 échantillons montraient des différences par rapport au profil commun ; trois d'entre eux présentaient des différences dans l'intensité relative de quelques bandes (phylotypes) alors que les deux autres montraient des différences en terme de présence/absence de bandes (phylotypes). Précisons que ces deux derniers échantillons provenaient de l'embouchure de deux affluents du lac, mettant en évidence un impact direct de la rivière sur la composition de la communauté bactérienne. Cette influence agit néanmoins sur une faible distance qui se limite lors de nos prélèvements, à l'embouchure des rivières. Bergström et Jansson (2000) suggèrent que l'influence de la communauté affluente est négligeable pour un lac caractérisé par un grand volume d'eau et un temps de renouvellement d'eau important, ce qui est le cas pour le lac du Bourget (10 ans).

Le fait qu'en hiver la composition de la communauté bactérienne soit globalement très homogène sur une échelle verticale et horizontale est en concordance avec certaines

caractéristiques hydrodynamiques de ces lacs et notamment avec le brassage des eaux pendant cette période. Il faut d'ailleurs noter, que non seulement les données concernant la composition eubactérienne étaient très homogènes, mais qu'il en était de même pour les données physico-chimiques et pour l'abondance bactérienne.

En été durant la période de stratification thermique de la colonne d'eau, la composition variait surtout à l'échelle verticale, et d'une façon moindre à l'échelle horizontale. L'ensemble des échantillons prélevés dans l'épilimnion (0 et 2 m) partageait le même profil de DGGE, en accord avec l'homogénéité des paramètres physico-chimiques. La plus grande hétérogénéité horizontale des profils de DGGE a été trouvée pour l'ensemble des échantillons prélevés au niveau du métalimnion (15 m). Cette hétérogénéité semble être directement liée à des processus hydrodynamiques dans le lac Bourget appelés seiches (Freissinet et al., 2004). Ces processus déclenchent des déplacements verticaux des masses d'eau provoqués par les effets conjugués du vent et du fait que deux masses d'eau thermiquement distinctes composent la colonne d'eau. Les échantillons de l'hypolimnion (30 et 50 m) étaient caractérisés par deux profils légèrement différents de DGGE, l'un spécifique aux échantillons prélevés à 30 m et le second spécifique aux échantillons prélevés à 50 m. La présence de ces deux communautés était probablement une conséquence des concentrations différentes d'un paramètre chimique, le phosphate, dont les valeurs varient beaucoup entre 30 et 50 m de profondeur (2 et 28  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de respectivement). Le pouvoir de structuration de la diversité bactérienne par les concentrations en phosphate n'a rien de surprenant puisque la disponibilité en phosphate contrôle non seulement la production primaire mais aussi la production bactérienne (Thingstad et Lignell, 1997; Thingstad et Rassoulzadegan, 1999; Van Wambeke et al., 2002). Son influence sur la diversité bactérienne avait d'ailleurs déjà été observée (Morris et Lewis, 1992; Pinhassi et Hagström, 2000; da Silva et Nahas, 2002). Enfin notons que, l'établissement de deux communautés différentes au sein d'une même couche thermique, requiert une stratification suffisamment stable, ce qui a été le cas pour l'hypolimnion à cette date estivale d'échantillonnage.

Les différences majeures, observées au niveau de l'échelle verticale sont en accord avec les observations de Dominik *et al.* (2002) dans le lac Plußsee et avec celles de Øvreås et al. (1997) dans le lac Sælenvannet. Cela n'est pas surprenant si l'on considère qu'en milieu aquatique tempéré les couches d'eau (épilimnion, métalimnion et hypolimnion) sont caractérisées par la présence de gradients de température et d'oxygène, facteurs qui sont eux-mêmes reconnus pour avoir des effets sur la diversité des communautés bactériennes (*ex.* : (Ward et al., 1998; Bosshard et al., 2000)). Dans les écosystèmes lacustres stratifiés

l'épilimnion est généralement bien mélangé et fonctionne comme un bioréacteur pour la production primaire, alors que l'hypolimnion est un endroit où la biomasse s'accumule et est recyclée (Wetzel, 2001). Selon Massana *et al.* (1997), la profondeur est une variable majeure pouvant expliquer la répartition des communautés bactériennes dans un milieu aquatique. En réalité, plusieurs variables biologiques et facteurs physicochimiques évoqués dans le chapitre I (nutriments, température, pression hydrostatique, prédation, etc.) sont également corrélés à cette variable.

Les analyses de DGGE effectuées dans le cadre de l'**article III** ont confirmé la présence de communautés bactériennes couche-spécifiques en été et non différenciées en période de brassage hivernale selon une échelle verticale au sein de chaque lac. Ces résultats corroborent donc les résultats de l'article II. Plus précisément, les échantillons qui étaient prélevés dans le lac du Bourget au niveau d'un site et de deux profondeurs également échantillonnées pour l'article II (point de référence B ; à 2 et à 50 m), présentent un profil de DGGE identique en hiver et au contraire des profils différents en période de stratification des eaux (printemps et été) en accord avec le profil thermique de la colonne d'eau. Des résultats en DGGE analogues ont été obtenus pour le lac d'Annecy et le lac Léman.

Toujours dans le cadre de l'article III, en parallèle aux analyses de DGGE, nous avons également analysé les assemblages bactériens à l'aide de la technique de clonage-séquençage. Compte tenu du fait que le nombre de séquences analysées par échantillon n'était pas suffisant afin d'établir une image représentative de la diversité spécifique, nous nous sommes limités aux grands groupes taxonomiques (*Actinobactéries*,  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -*Protéobactéries*, C-F-B, etc.). Cette approche a notamment montré que la proportion relative d' $\alpha$ -*Protéobactéries* était plus grande en surface qu'en profondeur, et inversement pour les *Actinobactéries* du groupe IV. Etant donné que les *Actinobactéries* peuvent se développer à de faibles concentrations en carbone organique et à de faibles températures (Glöckner *et al.*, 2000), alors que les  $\alpha$ -*Protéobactéries* peuvent devenir dominantes dans des milieux riches en nutriments grâce à leur croissance rapide par rapport aux *Actinobactéries* (Burkert *et al.*, 2003; Hahn, 2003), il est possible que ces deux groupes occupent des niches écologiques différentes.

**Pour conclure, il apparaît donc, que l'essentiel de la variabilité observée dans la composition des communautés eubactériennes du lac du Bourget se situe sur une échelle verticale plutôt qu'horizontale lorsque le lac est thermiquement stratifié. Cette variabilité verticale reflète la présence de couches thermiques différentes et de couches chimiques (notamment par rapport au phosphate), favorisant l'établissement de**

**communautés différemment adaptées aux conditions qu'elles rencontrent. Pendant la période de non stratification (hiver), la communauté est homogène sur l'ensemble de la masse d'eau. Pour le lac Bourget, l'influence des tributaires sur la composition de la communauté eubactérienne est restreinte à la zone de l'embouchure. Il est cependant probable qu'en période de crue, la signature bactérienne des rivières affluentes puisse s'observer sur une échelle plus large. Au cours de ce travail de thèse, nous n'avons échantillonné ni les zones proches des berges du lac, ni à l'interface eau et sédiment où des changements de la diversité bactériennes peuvent également être attendus.**

Enfin, il apparaît donc que par rapport à d'autres matrices tel que le sol par exemple, l'eau des lacs constitue un milieu beaucoup plus homogène, sur des grandes distances horizontales et parfois même verticales. La grande homogénéité d'un milieu aquatique est une caractéristique unique de ces écosystèmes. Ici, les barrières à la dispersion des espèces sont faibles (Giller et al., 2004), ce qui pourrait d'ailleurs expliquer que les milieux aquatiques étudiés, soient caractérisés par une diversité **relativement faible**. D'une façon générale, il apparaît que tous les milieux aquatiques se caractérisent par une plus faible diversité bactérienne que celle des milieux terrestres ou des sédiments (Torsvik et al., 2002). Ceci a été mis en évidence par les analyses de réassociation d'ADN pour chaque milieu. Ainsi, un échantillon d'eau douce et un échantillon d'eau marine contenait ~160 équivalents génomes d'*E. coli* (Ritz et al., 1997) ce qui correspond à environ 550 espèces (Jaspers et al., 2001). Øvreås et al. (1998) ont observé ~8.000 équivalents génomes d'*E. coli* dans un échantillon de sol de pâturage. Torsvik et al. (1998) ont estimé à 6.000 leur nombre dans un sol forestier et à 11.4000 dans du sédiment marin. Enfin Sandaa et al. (1999) évaluent cette valeur à 6.000 dans 1 g de sol non contaminé et à 2.000 dans un sol pollué. D'autres études sont mentionnées dans Jaspers et al. (2001). Cet ensemble d'exemples montre qu'il y a un facteur d'à peu près 50 entre la diversité d'un échantillon aquatique et celle d'un échantillon de sol. Cette biodiversité plus grande dans les sols est probablement générée par l'hétérogénéité spatiale de la matrice sol qui crée un grand nombre de niches écologiques potentielles au sein desquelles les bactéries se diversifient et se spécialisent (Torsvik et al., 2002). Elle pourrait être aussi favorisée par le fait que plus le nombre d'espèces bactériennes et leurs abondances sont élevés et plus l'accumulation de mutations, et les échanges génétiques sont fréquents, ce qui contribue à créer de la diversité.



## 2. La représentativité d'un échantillon dans un grand lac

Les résultats de l'**article II** (et aussi de l'**article III**) nous laissent présager que pour un lac profond (pour nous les lacs d'Annecy, du Bourget et le Léman), un nombre restreint d'échantillons dans l'espace horizontal suffit pour estimer de façon fiable et représentative la diversité bactérienne du lac par la technique de DGGE, à condition bien sûr, d'éviter les embouchure des affluents et les zones isolées telles que les baies. Ces endroits pourraient effectivement héberger des communautés spécifiques et différentes par rapport aux communautés de la zone pélagique ouverte. Ainsi, il devrait être suffisant de prélever un seul échantillon en situation de brassage des eaux et un échantillon par profondeur caractéristique en situation de stratification. Etant donné que la DGGE ne détecte pas les populations présentes au dessous d'un certain seuil d'abondance (Muyzer et al., 1993 ; Casamayor et al., 2000), on peut se poser la question de la généralisation de ce postulat à d'autres types d'approches techniques plus sensibles que la DGGE. Les travaux de Yannarell et Triplett (2004) semblent être en accord avec une généralisation du postulat, puisqu'ils montrent qu'avec la technique ARISA qui est plus sensible que la DGGE, la variabilité horizontale des profils relatifs à la composition eubactérienne, est négligeable au sein d'un même lac et cela pour un ensemble de 13 lacs étudiés. Ces auteurs ont trouvé 13% de variabilité horizontale sur une échelle de 10 m et 17% sur une échelle de 100 m au sein d'un même lac ; cette variabilité intra-lac étant largement inférieure à la variabilité inter-lacs (75%). La variabilité horizontale était attribuée aux prélèvements et analyses d'échantillons en provenance des zones littorales des lacs.

**Pour conclure, à condition d'éviter le littoral, les zones isolées et les zones d'interfaces, un point de prélèvement pourrait être suffisant pour décrire de façon représentative la composition de la communauté eubactérienne à l'échelle horizontale d'un grand lac.**

En revanche, à l'échelle verticale, nous avons montré qu'il peut exister et cela en période de stratification, des variations plus ou moins importantes dans la composition des communautés bactériennes (voir sous-chapitre précédent). Ces variations ont pu être reliées à la présence de déplacements verticaux des masses d'eau d'une part et d'autre part à la présence de deux niveaux différents en phosphates dans une même couche thermique. D'autres variables peuvent être distribuées de façon hétérogène au sein d'une même couche thermique et former des microcouches stratifiées. Ainsi, l'analyse du métalimnion de 24 lacs

dans le Wisconsin et dans le Michigan (USA) a confirmé l'existence de ces microcouches composées de plusieurs groupes de microorganismes phototrophes (cyanobactéries, bactéries vertes, phytoplancton eucaryotique, etc.). Cette microstratification a pu être reliée à deux paramètres principaux : la PAR (Photosynthetically Active Radiation) et le potentiel de réduction (Vila et al., 1998). Un résultat analogue a été obtenu par Tonolla et al. (2003) pour la chémocline du lac méromictique Cadagno (Suisse). D'autres variables, telles que les variables chimiques peuvent également être distribuées de façon hétérogène dans une couche thermique. Dans le cadre de l'article II, nous avons montré que deux niveaux de phosphates différents dans l'hypolimnion étaient probablement à l'origine de la structuration de deux communautés différentes.

**Il apparaît donc nécessaire d'utiliser en temps réel, des outils et des approches permettant d'une part de bien cibler la profondeur à laquelle on souhaite échantillonner et d'autre part de prélever dans le même temps les échantillons destinés à l'analyse de composition bactérienne et aux analyses chimiques des eaux.** Ainsi, on utilisera une sonde de température munie d'un capteur de pression si l'on souhaite échantillonner au sein d'une couche thermique. L'utilisation d'une telle sonde pour chaque site d'échantillonnage, permettra de bien situer les différentes couches thermiques au niveau de chaque site sans devoir se soucier des phénomènes hydrodynamiques tels que les seiches qui peuvent considérablement modifier la position de la thermocline d'un site à l'autre (jusqu'à 9 m dans le Bourget) au cours d'une même journée de travail (Freissinet et al., 2004). L'utilisation d'une sonde fluorimétrique (Leboulanger et al., 2002) est préconisée si l'on souhaite échantillonner par rapport à la présence de certains groupes phytoplanctoniques. Enfin, l'analyse chimique (mesure de COD, pH, phosphore total, phosphates, nitrates, nitrites, oxygène, etc.) de chaque échantillon prélevé est importante afin de disposer d'un maximum d'informations et de pouvoir éventuellement relier *a posteriori*, d'éventuelles différences de diversité bactérienne aux variations de ces paramètres.

### 3. Variabilité temporelle de la diversité

Après nous être intéressés à la variabilité spatiale de la composition des communautés eubactériennes, nous allons discuter maintenant des modifications temporelles observées pour deux modèles d'étude, les eubactéries mais aussi les cyanophages.

### 3.1. La variabilité saisonnière de la composition des communautés eubactériennes pélagiques dans les trois lacs

Dans le lac du Bourget en 2003, la comparaison du profil de DGGE d'hiver commun avec les profils « communs » relatifs à chaque profondeur en juin montre que la composition des communautés bactériennes ne varie pas de façon drastique entre janvier et juin (**article II**). Dans notre étude, au moins 70% des espèces présentes en janvier, l'étaient encore dans chaque couche thermique en juin, comme l'a montré le calcul de l'indice de similarité de Sorensen. De plus, il est apparu **que le profil d'hiver commun ressemblait plus aux profils des couches profondes en été qu'au profil commun d'été relatif à l'épilimnion. Les résultats physicochimiques issus de cette étude et ceux de l'article III montrent qu'entre les couches profondes d'été et la colonne d'eau d'hiver, seul les valeurs de température (et dans une moindre mesure l'oxygène) sont homogènes (autour de 6°C). Il semblerait donc, que la température puisse être à l'origine de cette ressemblance dans les profils de DGGE, ressemblance qui laisse présager une communauté adaptée à des faibles températures.**

La température est reconnue être un facteur qui stimule la production bactérienne (Autio, 1992 ; Kirchman et Rich, 1997), et ses variations peuvent être à l'origine de successions bactérioplanktoniques (Sieburth, 1967 ; Autio, 1992 ; Pinhassi et Hagström, 2000).

La comparaison par analyse hiérarchique d'autres profils de DGGE, notamment ceux décrits dans l'**article III** relatifs aux trois lacs, aux deux profondeurs (à 2 m et à 45-50 m) et au niveau de trois dates étudiées (hiver, printemps et été), a confirmé les résultats de l'article II. Les profils de DGGE d'hiver se regroupent avec les profils relatifs à la couche profonde (et pas avec ceux relatifs à l'épilimnion) de l'été et du printemps. Par ailleurs, l'observation du gel de DGGE montre qu'à l'exception de quelques échantillons (notamment ceux prélevés à 2 m au printemps), aucune différence drastique d'un lac à l'autre, d'une saison à l'autre ou d'une profondeur à l'autre ne peut être observée. Les résultats issus de la technique de clonage-séquençage de cette étude corroborent nos résultats de DGGE. Il apparaît notamment que les changements saisonniers majeurs concernent les proportions relatives des *α-Protéobactéries* et des *Actinobactéries* du groupe I. Les *α-Protéobactéries* sont notamment plus abondantes en été qu'aux autres dates, alors que les *Actinobactéries* du groupe I prédominent plutôt au printemps qu'aux deux autres dates. La plus forte abondance d'*α-Protéobactéries* en été qu'en hiver ou au printemps confirme les résultats de Zwisler et al.

(2003) obtenus par la méthode FISH dans le lac Constance (entre l'Allemagne, la Suisse et l'Autriche). Ce résultat est d'autant plus intéressant que ce lac ressemble de part sa situation géographique, sa profondeur et son état trophique, fortement au lac Léman. Si les  $\alpha$ -*Protéobactéries* augmentent en proportion entre le printemps et l'été, le contraire est vrai pour les  $\beta$ -*Protéobactéries*. Cette tendance pour ces deux groupes bactériens a déjà été observé en 2002 dans le lac du Bourget (résultats se referant aux mêmes profondeurs) (Comte et al., 2005). Quant au développement printanier des *Actinobactéries* du groupe I, il est possible que ces dernières puissent occuper la niche laissée libre par les  $\alpha$ -*Protéobactéries*. Il peut s'agir aussi d'un phénomène de prédation auquel certaines *Actinobactéries* ont montré pouvoir échapper et résister (Pernthaler et al., 2001; Hahn et al., 2003 ).

**En conclusion de cette analyse temporelle, émergent trois points : 1) l'absence de changements drastiques au cours des saisons avec des communautés qui sont relativement ressemblantes d'une saison à l'autre ; 2) la forte ressemblance saisonnière entre la composition eubactérienne d'hiver et la composition eubactérienne des couches profondes et 3) la variabilité plus forte par rapport à l'ensemble des échantillons de ceux récoltés en surface au printemps. En pratique, c'est au sein de l'épilimnion que nous avons observé le plus de changements dans la composition des communautés, mais aussi le plus de changements dans la biomasse phytoplanctonique et dans la température. Ces deux paramètres ont donc probablement un rôle majeur dans la structuration des communautés bactériennes des écosystèmes lacustres étudiés.** Il a d'ailleurs été montré que le phytoplancton influence non seulement le taux de croissance des bactéries et donc leur abondance (Maar et al., 2002), mais aussi la composition des communautés bactériennes (Acinas et al., 1997; Pinhassi et al., 2003 ; Pinhassi et al., 2004 ).

Nos résultats concordent partiellement avec ceux de Pernthaler et al. (1998) qui ont mis en évidence par la méthode FISH, que la composition de la communauté pélagique d'*Archaea* et d'eubactéries d'un lac de haute montagne (lac Gossenköllesee, Autriche), était majoritairement influencée par la fonte de la couche de glace, probablement associée à l'introduction de bactéries allochtones, au brassage thermique des eaux et par l'augmentation du rayonnement lumineux. En parfait accord avec nos résultats, Pinhassi et Hagström (2000) suggèrent que la succession d'espèces bactérioplanctoniques soit le résultat de variations de divers facteurs, notamment de la température, des concentrations en phosphate et en chlorophylle *a*, qui favorisent à différents moments de l'année, l'établissement de différents phyla bactériens. De façon similaire, Schauer et al. (2003) suggèrent que ce sont les variations de la MOD produites par les successions algales qui sont à l'origine, avec la température, de

la structuration d'une communauté bacterioplanctonique marine. Un certain nombre d'auteurs attribuent des changements drastiques à l'activité du broutage et de la prédation surtout pendant la phase des eaux claires (*ex.* : dans le lac Plußsee, (Höfle et al., 1999)). Cette hypothèse doit être vérifiée dans le futur.

Enfin, selon Yannarell et al. (2003), les patrons de variations saisonnières sont plus prévisibles et constants d'une année sur l'autre, pour un lac de grande taille que pour un lac de petite taille, en raison de leur capacité de tampon contre les changements induits par le climat. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse.


### **3.2. La variabilité saisonnière de la composition des communautés de cyanophages en zone pélagique dans le lac du Bourget**

La composition des communautés de cyanophages lacustres, échantillonnées à une profondeur de 5 m dans le lac du Bourget et analysées par DGGE et par la technique de clonage-séquençage, varie très nettement en fonction de la saison (**article IV**). Les changements les plus importants sont observés entre Octobre et Novembre. Un certain nombre d'hypothèses doit être prise en compte afin de tenter d'expliquer ces changements. Selon Sime-Ngando (1997), deux principaux facteurs affectent l'abondance virale dans le temps et dans l'espace : la température et la matière organique dissoute. D'autre part, si la diversité virale est étroitement liée à la diversité de l'hôte spécifique (Angly et al., 2005), alors les mêmes facteurs impliqués dans la structuration des communautés hôtes affectent également la diversité des virus (Wommack et al., 1999). Une analyse plus fine des résultats obtenus avec la sonde fluorimétrique à 5 m révèle un changement de température entre les dates d'Octobre et Novembre (17°C à 11°C) et un changement drastique de la teneur en chlorophylle *a* et plus spécifiquement de la contribution relative des populations photosynthétiques. Il apparaît notamment que pour Septembre et Octobre les valeurs de chlorophylle *a* varient entre 1,95 et 1,45 µg.L<sup>-1</sup> respectivement, alors que pour Novembre et Décembre, ces valeurs augmentent respectivement à 5,86 et 6,38 µg.L<sup>-1</sup>.

**Cet ensemble de données indique 1) que la composition des communautés de cyanophages subit des changements saisonniers et 2) que ces changements sont probablement liés indirectement ou directement à la température et à la chlorophylle *a*. La diversité virale semble donc être en étroite dépendance avec la diversité de l'hôte.**

Ces résultats sont en accord avec ceux de Øvreås et al. (2003) qui montrent que l'addition de nutriments affecte d'une part la diversité bactérienne et d'autre part la diversité virale. Des changements temporels de la communauté de cyanophages dans les eaux de Rhode Island ont été observés Marston et al. (2003) sans pour autant pouvoir relier ses changements à des facteurs environnementaux. Enfin, Wommak et al. (1999) observent aussi des changements de la composition dans les communautés de virus planctoniques dans la baie de Chesapeake qui sont liés à un effet saisonnier. Ces auteurs suggèrent que ces changements dépendent d'un ensemble de paramètres environnementaux dont le degré de stratification de la colonne d'eau.

#### **4. Quelle est la composition des communautés eubactériennes et cyanophages dans les lacs subalpins étudiés ?**

Compte tenu du faible nombre de données disponibles portant sur la composition taxinomique des eubactéries des grands lacs tels que les lacs Alpains, il nous est apparu évident qu'il était nécessaire de procéder à un inventaire des principaux groupes taxinomiques présents. L'**article III** présente un inventaire des bactéries présentes dans les lacs d'Annecy, du Bourget et le Léman, alors que l'**article IV** concerne une première évaluation de la communauté des cyanophages du lac du Bourget. 

##### **4.1. Analyse taxinomique de la communauté eubactérienne**

Avant de rentrer dans les détails des résultats, nous rappelons au lecteur que ceux-ci se réfèrent à la fraction de bactéries comprises entre 0,2 et 2  $\mu\text{m}$  de taille. Nos résultats reflètent donc vraisemblablement la fraction de bactéries dites libres, et pas la fraction des bactéries fixées à des particules micro- ou macroscopiques ou des bactéries de grande taille (certaines cyanobactéries). Un certain nombre d'études ont mis en évidence des différences taxinomiques entre la communauté de bactéries libres et celle des bactéries fixées (*ex.* : (DeLong et al., 1993; Crump et al., 1999)) mais d'autres observent le contraire (Selje et Simon, 2003). Nous ne tenons pas compte non plus des bactéries de taille  $< 0,2 \mu\text{m}$  qui peuvent être elles-aussi une source de diversité (Hahn et al., 2003; Miyoshi et al., 2005).

**Dans les trois lacs étudiés, nous avons pu identifier au total 60 OTUs sur un ensemble de 480 séquences eubactériennes. En surface comme à 50 m de profondeur, en hiver, comme au printemps ou en été, le groupe taxinomique dominant correspond à**

**celui des *Actinobactéries* (51% de toutes les séquences d'eubactéries).** Ce résultat est en accord avec d'autres travaux qui indiquent que les *Actinobactéries* peuvent constituer une fraction substantielle du bactérioplancton d'eau douce. Ainsi, lors d'une étude saisonnière effectuée avec la méthode FISH dans un lac autrichien oligotrophe (le lac Gossenköllesee), Glöckner et al. (2000) ont mis en évidence que les *Actinobactéries* pouvaient contribuer jusqu'à 63% de la biomasse bactérioplanctonique. Des résultats similaires ont été obtenus quelques années plus tard, dans ce même lac mais également dans d'autres lacs avec une version modifiée de la méthode CARD-FISH (Sekar et al., 2003).

**Le deuxième groupe le plus abondant dans notre étude est celui des *Protéobactéries*, notamment les sous groupes des  $\alpha$ -,  $\beta$  et  $\gamma$ -*Protéobactéries*, correspondant respectivement à 16%, 16% et 2,7% de la totalité des séquences d'eubactéries identifiées.** Ces résultats sont une nouvelle fois en accord avec plusieurs études effectuées au sein de divers écosystèmes lacustres. A titre d'exemple, à l'aide de la méthode FISH, l'étude de Glöckner et al. (1999) a montré que dans les lacs qu'ils étudiaient, la fraction des  $\alpha$ - et des  $\gamma$ -*Protéobactéries* variait respectivement de 1 à 10%, et de 1 à 5% de la fraction totale des bactéries. Cette même étude a mis en évidence l'importance quantitative des  $\beta$ -*Protéobactéries* (entre 3 et 32% de bactéries totales) en eau douce et leur quasi absence en eau marine (Glöckner et al., 1999). Des proportions similaires des trois sous-groupes des *Protéobactéries* ont été trouvées également par Hiorns et al. (1997) au sein des lacs de la région Américaine d'Adirondack. Enfin, dans quatre lacs Suédois, les  $\alpha$ -*Protéobactéries* constituaient entre 4 à 18% de la communauté bactérienne (Eiler et Bertilsson, 2004). La communauté bactérienne ( $\alpha$ -,  $\beta$  et  $\gamma$ -*Protéobactéries*, *C-F-B* et *Archaea*) du lac du Bourget a été suivie de Mars à Juillet 2002 entre 2, 6, 10, 30 et 50 m de profondeur par la méthode de FISH au niveau du point B (Comte et al., 2005). Cette étude montre que la communauté eubactérienne est largement dominée par les *C-F-B* (entre 37,8 et 97%), suivi par les  $\beta$ - (au maximum 14% des bactéries totales) et enfin par les  $\alpha$ -*Protéobactéries* (au maximum 4,7% des bactéries totales).

**Alors que les travaux de Comte et al. (2005) montrent une abondance remarquable de *C-F-B* en 2002 dans le lac du Bourget, nos travaux ne révèlent qu'une faible présence de ce groupe au sein des lacs du Bourget, d'Annecy et du Léman (seulement 5%).** Ces auteurs qui ont travaillé sur la fraction d'eau totale, ont également mis en évidence que jusqu'à de 17,4% des *C-F-B* étaient des cellules filamenteuses. L'abondance de bactéries filamenteuse appartenant aux *C-F-B* a été montrée également par Pernthaler et al. (1998) dans un écosystème lacustre. La faible présence de *C-F-B* dans nos écosystèmes

lacustres nous a d'autant plus étonné que dans le lac Constance, des fortes abondances de ce groupe ont également été mises en évidence (Zwisler et al., 2003). Ces auteurs ont cependant travaillé sur la fraction d'eau totale.

**Il apparaît donc, que l'incohérence apparente entre nos résultats quant aux contributions relatives des C-F-B pourrait être due à la préfiltration qui a retenu les C-F-B. Un autre biais d'analyse pourrait venir de l'apparente sous-estimation de ce groupe par la méthode de séquençage par rapport à la méthode FISH** (Kirchman, 2002b). Ainsi, les études effectuées par la méthode de FISH ont révélé que ce groupe bactérien était très abondant et souvent numériquement dominant dans des écosystèmes marins et d'eau douce (Glöckner et al., 1999 ; Giovannoni et Rappé, 2000 ; Kirchman, 2002b ; Selje et Simon, 2003). Il semblerait être notamment particulièrement abondant dans la communauté fixée aux particules (Selje et Simon, 2003) et au cours de proliférations phytoplanctoniques (van Hannen et al., 1999; Riemann et al., 2000 ), en rapport avec sa capacité de dégradation de molécules complexes (Kirchman, 2002a). Au contraire, ce groupe est particulièrement sous-représenté dans les banques de clones d'ARN 16S de bactérioplancton pélagique (Glöckner et al., 1999 ; Eilers et al., 2000b).

Le criblage des banques de clones concernant les trois lacs étudiés et la comparaison des séquences obtenues avec les séquences publiées disponibles au NCBI, ont mis en évidence que **seul un faible pourcentage de séquences n'a pas d'homologie forte avec des séquences typiques d'eau douce**. Ce résultat corrobore un certain nombre d'études qui suggèrent que le bactérioplancton d'eau douce forme un « cluster » phylogénétiquement distinct et séparé de ceux regroupant les bactéries originaires d'écosystèmes marins ou terrestres (Glöckner et al., 2000; Zwart et al., 2002 ).

**En conclusion, si la comparaison des séquences eubactériennes des lacs d'Annecy, du Bourget et du Léman à celles publiées dans les banques disponibles, a montré que les Actinobactéries constituaient un groupe substantiel au sein de ces communautés, elle a aussi mis en évidence que 85% des séquences avait de fortes homologies avec des séquences typiques des écosystèmes lacustres ce qui montre la spécificité des communautés en fonction des biotopes d'origine (aquatique/terrestre/sédiment...).**



## 4.2. Analyse taxinomique de la communauté de cyanophages

L'analyse taxinomique de l'ensemble des séquences issues de l'amplification du gène codant pour la protéine g20, spécifique des cyanophages (cyanomyophages) (Fuller et al., 1998), a mis en évidence une diversité de cyanophages relativement grande. Sept OTUs ont pu être décrites au cours du suivi. Une diversité semblable des communautés de cyanophages avait été observée par Sullivan et al. (2003) et Zhong et al. (2002) dans des écosystèmes marins. Ces auteurs suggéraient que cette diversité pouvait s'expliquer par des échanges génétiques fréquents entre hôte et virus ou entre particules virales au moment de l'infection de la cellule hôte mais aussi parce que l'importante diversité de la communauté hôte génère une grande diversité de la communauté de cyanophages, compte tenu de la spécificité hôte-parasite (Wommack et Colwell, 2000; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004).

Par comparaison phylogénétique de nos séquences avec celles obtenues en milieu marin, nous avons constaté que certaines de nos séquences étaient plus proches de séquences de cyanophages marins que des autres séquences de cyanophages du lac Bourget. Cela laisse présager que certains cyanophages d'eau douce et d'eau marine partagent un ancêtre commun suffisamment récent pour qu'il n'y ait pas eu d'isolement phylogénétique entre les séquences marines et les séquences d'eau douce. Ce résultat est aussi en accord avec le fait qu'il existe des relations phylogénétiques fortes entre des populations marines et d'eau douce de *Synechococcus* spp. (les populations de *Synechococcus* sont des hôtes probables des cyanophages du lac du Bourget) (Honda et al., 1999) (Jacquet, communication personnelle).


Récemment, Short et Suttle (2005) ont comparé nos séquences avec une multitude d'autres séquences provenant d'environnements marins et d'eaux douces. Ces auteurs confirment tout d'abord nos résultats quant à l'existence de séquences quasiment identiques (> 99%) issues d'écosystèmes d'eau douces et marines. Cependant, ils révèlent aussi que les amorces utilisées dans les différents travaux ne sont peut être pas spécifiques des cyanophages et qu'elles hybrident peut être aussi avec des séquences de bactériophages. Ils concluent en disant que d'autres études seront nécessaires pour explorer les mécanismes qui interviennent dans le contrôle de la distribution et du maintien des génotypes g20 dans les milieux naturels.

## 5. Les facteurs pouvant influencer la diversité des communautés microbiennes

### 5.1. Profondeur, saison ou état trophique ?

Les analyses de DGGE et de clonage-séquençage présentées dans l'**article III**, montrent que la composition des assemblages bactériens change en fonction de la profondeur (surface ou à 45-50 m) et de la saison (hiver, printemps, été) et non en fonction de l'origine géographique et donc de leur état trophique des lacs (Annecy : oligotrophe ; Bourget et Léman : mésotrophes). **L'influence de l'état trophique des lacs du Bourget, d'Annecy et du Léman sur la diversité des communautés bactériennes semble donc négligeable par rapport à l'influence de la profondeur et de la saison** alors que ce paramètre, ou plus généralement la quantité et la composition en "nutriments" de l'eau, sont connues comme étant des facteurs structurant fortement les communautés bactériennes. Ainsi, l'étude de Methé et Zehr (1999) a mis en évidence l'effet de la concentration en COD sur les abondances de certains groupes bactériens dans plusieurs lacs américains. Selon van der Gucht et al. (2001) la différence marquée entre deux communautés bactériennes planctoniques de deux systèmes lacustres géographiquement très proches serait attribuable à la présence de macrophytes dans un des deux lacs qui, d'une part, stimuleraient le relargage du phosphore provenant des sédiments, et d'autre part, consommeraient de l'azote.

Enfin, Lindström (2000) a montré des différences de la composition bactérioplanctoniques de plusieurs lacs qui dépendraient de l'état trophique et du contenu en substances humiques.

De l'analyse de nos résultats, il apparaît cependant, que quelques changements drastiques dans la composition des communautés eubactériennes peuvent intervenir sporadiquement au niveau de l'épilimnion au printemps et en été lorsque les biomasses phytoplanctoniques sont élevées. Ces changements traduisent le potentiel adaptatif de nos communautés eubactériennes par rapport à des modifications de leur environnement nutritionnel. Cependant, ils ne durent pas dans le temps et sont limités à une faible proportion de la masse d'eau totale. Suite à ces épisodes, un retour à un état initial commun aux trois lacs est observé. 

## **5.2. Influence de bactéries allochtones sur la composition bactérienne lacustre**

L'**article II** a montré que la composition de la communauté eubactérienne du lac du Bourget n'est pas influencée par les communautés eubactériennes apportées par les tributaires du lac. Ceci est valable pour l'ensemble des points analysés à l'exception des embouchures. Comme nous l'avons déjà dit dans un paragraphe précédant, nos résultats sont en accord avec les conclusions de Bergström et Jansson (2000) qui suggèrent que l'influence de la communauté affluente est négligeable pour un lac caractérisé par un grand volume d'eau et un temps de renouvellement important (10 ans dans le cas du lac du Bourget). Une étude relativement récente conduite sur deux lacs Suédois caractérisés par des temps de renouvellement d'eau différents, aboutit aux mêmes conclusions (Lindström et Bergström, 2004). En revanche, dans des lacs de plus petits volumes et à temps de renouvellement courts, une forte influence des apports par les tributaires peut être observée (Lindström, 1998 ; Crump et al., 2003). D'autres écosystèmes aquatiques, tels que les estuaires ou les zones d'« upwelling » sont susceptibles de recevoir des apports allochtones en bactéries (Crump et al., 2003). Cet apport en bactéries allochtones (de sources marines et de rivière) dans un estuaire peut être important d'un point de vue quantitatif et dépendant du temps de renouvellement d'eau et de l'efficacité de la croissance des bactéries (Crump et al., 2004).

Nos résultats présentés dans l'**article III** montrent qu'un très fort pourcentage de séquences obtenues pour les lacs d'Annecy, Bourget et Léman ont de fortes identités (> 95%) avec des séquences d'autres écosystèmes d'eau douce. Plus précisément, 85% de séquences étaient des **séquences d'origine lacustre** et décrites auparavant par d'autres auteurs (Glöckner et al., 2000 ; Riemann et Winding, 2001; Simek et al., 2001 ; Urbach et al., 2001 ; Zwart et al., 2002 ; Burkert et al., 2003 ; Crump et al., 2003 ; Zwisler et al., 2003; Eiler et Bertilsson, 2004 ).

**En conclusion, nos résultats indiquent donc que les lacs d'Annecy, du Bourget et le Léman hébergent des communautés eubactériennes typiques des écosystèmes lacustres. Ainsi, il apparaît que les communautés des écosystèmes lacustres résistent bien aux perturbations qui peuvent survenir dans leur biotope. C'est ainsi que l'apport d'espèces allochtones qui pourraient être potentiellement des espèces invasives, n'a pas de conséquences évidentes et mesurables sur la composition de ces communautés. La conservation des équilibres dynamiques dans ces lacs semblent donc traduire un bon fonctionnement global de la communauté eubactérienne.**

### 5.3. Influence locale ou régionale ?

L'impact relatif des pressions de sélection locales (intra-lac) par rapport à celui des pressions de sélection régionales peut varier considérablement selon les études. Yannarell et Triplett (2005) se sont proposés d'identifier les facteurs qui peuvent influencer la diversité bactérioplanctonique de 30 lacs, situés dans le Nord et le Sud du Wisconsin. Les différences observées par le biais de la technique ARISA, montrent une influence forte des facteurs géographiques sur une échelle régionale (Nord ou Sud) en liaison avec de multiples facteurs. En plus de ces paramètres géographiques, d'autres paramètres, tels que le temps, les gradients de pH et de turbidité de l'eau semblent contribuer aux différences de diversité observées (Yannarell et Triplett, 2005).

Dans le cadre de notre étude, les résultats issus du clonage-séquençage et de la DGGE présentés dans l'**article III** montrent que les assemblages bactériens des trois lacs se ressemblent fortement, malgré leurs statuts trophiques contrastés et malgré la présence ou l'absence de proliférations de cyanobactéries. Nous avons déjà montré qu'il est probable que la forte ressemblance entre les divers assemblages bactériens soit due au grand volume de ces lacs (hypolimnion) qui se caractérisent par de nombreux paramètres et processus communs (climats, le pH, l'alcalinité, oxygène, etc.).

**Ainsi, des contraintes environnementales partagées s'exerçant à une échelle régionale ont une forte influence sur la structuration des communautés eubactériennes dans les lacs du Bourget, d'Annecy et le Léman à l'échelle annuelle alors que les contraintes locales, notamment l'état trophique de ces trois lacs, ne semblent agir que beaucoup plus ponctuellement dans l'espace et dans le temps. En dépit du fait que de nombreux travaux suggèrent que la prédation ou le parasitisme viral ont un impact potentiel important sur la composition des communautés bactériennes (Jardillier, 2004), il apparaît cependant à travers nos résultats que cet impact n'a sans doute qu'une influence relativement limitée dans l'espace et dans le temps par rapport aux pressions sélectives partagées à l'échelle régionale. L'autre enseignement important de ces résultats est que les pollutions par les nutriments et leurs conséquences sur le développement du phytoplancton, n'ont pas eu de conséquences irréversibles sur la composition et sans doute le fonctionnement des communautés eubactériennes de ces lacs.**



## -CHAPITRE V- CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

### 1. Conclusions générales

Les réflexions et travaux présentés dans ce document ont apporté des éléments de réponse relatifs à la variabilité de la composition eubactérienne dans les grands lacs Alpains français (Annecy, Bourget, Léman) et des informations quant à la composition et diversité cyanophage dans le lac du Bourget.

La première étude concernait la variabilité de la composition eubactérienne et la représentativité d'un échantillon au sein du lac du Bourget. A notre connaissance cette étude est la première qui ait pris en compte un nombre aussi important d'échantillons en provenance de sites et de profondeurs différents dans un lac de grande taille. Les résultats issus de ces travaux nous ont conduit à conclure qu'un nombre restreint d'échantillons était suffisant pour obtenir une estimation correcte de la diversité à l'échelle d'un tel écosystème, à condition d'éviter les zones isolées (baies et embouchure des tributaires). Ce premier travail a facilité la comparaison de la diversité eubactérienne du lac du Bourget avec deux autres lacs taille similaire, le lac d'Annecy et le lac Léman.

Dans la deuxième étude, dans chacun de ces lacs, la collecte d'échantillons d'eau a été réalisée à deux profondeurs (2 et 45-50 m) et à trois saisons (printemps, été, hiver). Cette comparaison a montré qu'en dépit de statuts trophiques très différents, la composition globale des communautés eubactériennes pélagiques était très ressemblante d'un lac à l'autre. Il est probable que cette grande ressemblance soit due au partage d'un certain nombre de facteurs physico-chimiques qui contraignent la composition des communautés. L'origine commune de ces écosystèmes dans une même écorégion, assujettie à des contraintes environnementales semblables, pourrait expliquer nos résultats. Ce travail a fourni également un inventaire important des espèces eubactériennes qui se développent dans ces lacs. Il a également été montré que ces écosystèmes semblent être peu influencés par les apports de bactéries allochtones et qu'ils contiennent des communautés qui leur sont propres. L'analyse des séquences a permis également de révéler la prédominance des *Actinobactéries*, devant les *Protéobactéries* et les *C-F-B* au sein du bactérioplancton des trois lacs étudiés. La proportion de certaines sousdivisions eubactériennes des *Actinobactéries* et des *Protéobactéries* semble

changer avec la saison et la profondeur, en accord avec la littérature actuelle. Il est très probable que la modification de la composition de la communauté selon les saisons et la distribution spatiale dans la colonne d'eau traduit une adaptation de celle-ci à la fois à des facteurs et processus biologiques et à des contraintes physico-chimiques. Afin de conclure sur ce sujet il nous semble utile de rappeler que le nombre d'OTUs présentes dans les trois lacs, estimé à l'aide de l'indice de Chao1 (entre 15 et 50 genres ou espèces par échantillon), est bien plus faible que celui généralement observé dans d'autres écosystèmes comme le sol par exemple. Les lacs du Bourget, d'Annecy et le Léman ne présenteraient donc pas une communauté eubactérienne très diversifiée.

Enfin, la troisième et dernière étude concernait l'appréhension de la composition et diversité de la communauté des cyanophages dans le lac du Bourget qui se caractérise par le développement saisonnier d'un hôte potentiel de ce type de virus, la cyanobactérie filamenteuse *Planktothrix rubescens*. Ce travail pionnier en milieu lacustre, a fourni une première série de séquences de cyanophages alors que, à notre connaissance, toutes les données disponibles concernaient les écosystèmes marins. Dans le lac du Bourget, nous avons constaté une très grande diversité de cyanophages et des changements de celle-ci au cours des saisons. Malgré l'abondance relativement importante de *P. rubescens* dans le lac du Bourget, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre la dynamique des cyanophages et la dynamique de cette cyanobactérie. A ce jour, aucun virus à *P. rubescens* n'a pu être isolé (S. Jacquet). L'abondance de la communauté de cyanophages semble plutôt corrélée à celle des picocyanobactéries et des bactéries hétérotrophes. Ces résultats suggèrent que les cyanophages que nous avons mis en évidence, sont probablement spécifiques des picocyanobactéries (ou des bactéries hétérotrophes si nous doutons de la spécificité des amorces) et/ou que *P. rubescens* ait pu développer des mécanismes de résistance. Cette dernière hypothèse reste totalement à vérifier. La première par contre est beaucoup plus probable puisqu'à partir des mêmes échantillons ayant servi à estimer la diversité des cyanophages, nous avons réussi à isoler deux virus infectant spécifiquement les picocyanobactéries des lacs d'Annecy et du Bourget (Jacquet et al, article en préparation).

## **2. Perspectives**

Les différents résultats obtenus au cours de nos travaux de recherche, et les réflexions plus générales concernant la fonction et l'origine de la biodiversité nous ont conduit à proposer diverses perspectives à ces travaux. A l'issue de cette thèse, il est clair que nous n'avons pas pu répondre à toutes les questions posées initialement. Par exemple, les relations entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes lacustres n'ont pas été abordées.

Dans les paragraphes suivants, nous parlerons tout d'abord d'outils techniques prometteurs pour pouvoir relier la diversité taxonomique à la diversité fonctionnelle. Ensuite, nous aborderons des perspectives de recherche qui pourront apporter des connaissances supplémentaires quant aux facteurs et processus qui peuvent influencer la diversité bactérienne et virale en milieu aquatique. Enfin, nous évoquerons les moyens qui nous semblent le plus pertinents aujourd'hui pour appréhender les relations entre la biodiversité et le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes.

### **2.1. Réflexions sur les perspectives techniques**

Avant l'introduction des méthodes moléculaires, il y a environ quinze ans, notre connaissance de la diversité des procaryotes et des virus était très partielle et ne reflétait qu'une maigre proportion des espèces présentes. Cela était due en grande partie au fait que la détection et l'identification d'espèces reposaient sur l'isolement et la mise en culture des organismes et que seul un faible pourcentage de ces bactéries était cultivable (Amann et al., 1995). Par ailleurs, les critères morphologiques et morphométriques des bactéries et de virus ne sont pas suffisants pour assurer une identification correcte et suffisante des espèces.

Les techniques moléculaires ont permis d'avoir accès à tout une partie de la diversité bactérienne et virale jusque-là ignorée. Parmi la multitude de techniques moléculaires disponibles, nous pouvons distinguer celles qui nécessitent au préalable une amplification par PCR de celles qui ne sont pas basées sur une amplification en PCR. Dans l'article I, nous avons proposé une revue des techniques moléculaires des communautés microbiennes



aquatiques, de la même manière que Ranjard et al. (2000) concernant les communautés microbiennes du sol.

Durant cette thèse, lors de l'analyse de la composition des communautés eubactériennes et des cyanophages, nous avons fait le choix d'associer et comparer une technique classique, celle du clonage-séquençage à une technique d'empreinte génétique, la DGGE. L'approche d'empreinte génétique a permis de comparer rapidement la composition de plusieurs communautés et a donné des résultats cohérents avec ceux obtenus par clonage-séquençage. En revanche, des limites et certains biais sont associés à chaque étape de la procédure : le prélèvement, le stockage, l'extraction de l'ADN, l'amplification par PCR, la visualisation des fragments, l'interprétation des profils de migration, etc. (Wintzingerode et al., 1997 ; Jackson et Churchill, 1999 ; Casamayor et al., 2000). D'autres limitations plus spécifiques à la DGGE, telles que la difficulté de comparer des profils complexes en provenance de deux gels différents et le caractère semi-quantitatif de la méthode, rendent cette technique peu adaptée pour des analyses portant sur un grand nombre d'échantillons.

La technique de clonage-séquençage a permis d'identifier des groupes taxonomiques et d'inférer les relations phylogénétiques entre les diverses OTUs. Cependant, il faut noter que des biais sont aussi introduits au niveau de l'extraction, de la PCR et de l'étape du clonage. Une limitation spécifique à cette technique est le nombre de clones (donc le temps et le coût nécessaire) qui doivent être séquencés afin de pouvoir correctement déterminer la diversité d'un écosystème. Cette limitation rend cette technique également contraignante pour déterminer la diversité dans des écosystèmes très diversifiés ou pour suivre des évolutions de diversité dans le temps et/ou l'espace. Les analyses de raréfaction appliquées aux résultats de l'article III ont montré que le séquençage d'une trentaine de clones n'était pas suffisant pour déterminer la diversité d'un échantillon en provenance d'un des trois lacs.

D'autres techniques sont donc nécessaires et nous en parlerons dans ce sous-chapitre. Nous présenterons notamment quelques techniques qui associent l'analyse de la diversité taxonomique à l'analyse fonctionnelle car elles me semblent très prometteuses. Elles pourront peut-être permettre de connaître dans l'avenir, le rôle joué par chaque groupe taxonomique et la signification fonctionnelle de la diversité des communautés microbiennes aquatiques.

### **2.1.1. Autres techniques d'empreinte génétique**

Des techniques d'empreinte génétique autres que la DGGE existent et ont été développées pour certaines d'entre elles assez récemment : La **T-RFLP** (Liu et al., 1997b ;

Marsh, 1999) et l'**ARISA** (Fisher et Triplett, 1999 ; Yannarell et Triplett, 2005). Ces deux approches se prêtent à des analyses à haute fréquence et contrairement à la DGGE, elles s'affranchissent partiellement du problème de la comparaison de gels lorsqu'elles peuvent être réalisées à l'aide d'un séquenceur à capillaire. Par ailleurs, l'utilisation d'un marqueur fluorescent permet non seulement de détecter des composants mineurs d'une communauté mais elle autorise aussi une analyse semi quantitative plus fine que la DGGE. Il faut pourtant noter, que l'étape de PCR obligatoire aux deux techniques, peut introduire les mêmes biais que ceux observés en DGGE. Pour plus de détails sur ces deux techniques nous invitons les lecteurs de consulter l'article I.

### **2.1.2. Comment mesurer la diversité fonctionnelle et la coupler à la diversité taxinomique ?**

Traditionnellement, les aspects concernant le rôle fonctionnel des microorganismes étaient étudiés en laboratoire à partir de cultures. Par exemple, les microorganismes capables de métaboliser un substrat spécifique étaient identifiés en cultivant des souches bactériennes dans un milieu de culture contenant ce substrat spécifique. Puis, les bactéries cultivées étaient caractérisées d'un point de vue physiologique, biochimique et plus récemment aussi d'un point de vue génétique. Mais d'autres techniques sont nécessaires afin de connaître le rôle fonctionnel ou les activités métaboliques des procaryotes (eubactéries et *Archaea*) qui sont non-cultivables pour leur grande majorité.

Depuis quelques années seulement, des approches ont été développées couplant l'identification taxinomique de microorganismes non cultivables à des analyses métaboliques. Quelques-unes de ces techniques sont discutées ci-dessous. La plupart d'entre elles sont très récentes et donc toujours en phase de développement (Torsvik et Ovreas, 2002).

La technique de **FISH-microautoradiographie** permet d'associer l'assimilation d'un produit radioactif à un microorganisme qui est lui-même détecté par hybridation *in situ* (FISH). Cette technique a été développée par Lee et al. (1999). Les études de populations bactériennes impliquées dans les cycles de l'azote et du carbone dans des communautés microbiennes complexes, sont de bons exemples de ses applications potentielles (Gray et al., 2000; Daims et al., 2001 ).

Une approche alternative à l'utilisation de marqueurs radioactifs est la technique de « **Stable Isotope Probing** » (SIP) qui utilise des isotopes stables afin d'identifier les composants actifs d'une communauté microbienne (Radajewski et al., 2000). Cette méthode est basée sur l'incorporation d'un substrat enrichi avec un isotope stable (pour l'instant le seul isotope utilisé est le  $^{13}\text{C}$ ) et sur l'identification de microorganismes actifs à travers l'isolement et l'analyse des composantes cellulaires contenant cet isotope (Dumont et Murrell, 2005). L'ADN et l'ARN sont des biomarqueurs taxonomiques intéressants. Nous distinguons la technique « DNA-SIP » de la « RNA-SIP », selon le type d'acide nucléique isolé et analysé. Dans les deux cas, un substrat enrichi en  $^{13}\text{C}$  est ajouté à l'échantillon pour une période plus ou moins longue, puis l'acide nucléique enrichi en  $^{13}\text{C}$  est séparé des acides nucléiques non marqués ( $^{12}\text{C}$ ) à travers une centrifugation dans un gradient de densité. La fraction qui contient l'acide nucléique enrichi est celle de la fraction microbienne active qui a incorporé le substrat initial. L'ADN ou l'ARN isolé peut être ensuite amplifié par PCR ou par RT-PCR (PCR en temps réel), respectivement, en ciblant par exemple des amorces sur le gène qui code l'ARN 16S des bactéries. C'est ainsi que la technique de DNA-SIP a été utilisée sur des échantillons de sol pour étudier les populations actives capables d'oxyder le méthane (les méthylotrophes ou méthanotrophes) (Morris et al., 2002b ; Radajewski et al., 2002 ; McDonald et al., 2005). La technique de RNA-SIP présente des avantages par rapport à la technique de DNA-SIP (plus rapide) ; elle a permis par exemple d'identifier les bactéries impliquées dans la dégradation du phénol au sein d'un bio-réacteur aérobique (Manefield et al., 2002). Cependant, plusieurs limitations de la méthode SIP en général, sont connues (Whitby et al., 2005) : les populations bactériennes assimilent en préférence le  $^{12}\text{C}$  par rapport au  $^{13}\text{C}$  ; des substrats non marqués peuvent diluer le substrat marqué.

La technique de **PCR en temps réel** ou PCR quantitative (en angl. : real-time PCR) est une analyse quantitative d'ADN ou d'ARN, basée sur l'utilisation de la PCR (Holland et al., 1991; Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996). En plus d'offrir tous les avantages de la PCR traditionnelle telles qu'une grande spécificité et sensibilité, elle permet par exemple d'estimer l'abondance initiale d'un gène dans un mélange d'ADN, en mesurant la formation des produits de PCR en phase exponentielle de la réaction (Klein, 2002). Parmi les applications, on trouve la quantification de l'abondance d'un gène ou d'une espèce dans une communauté microbienne naturelle (Dionisis et al., 2003) ou la quantification de l'abondance d'un ARNm spécifique dans des études d'expression d'un gène (études fonctionnelles) (Wawrik et al., 2002).

La **technique de microarray** (Lander, 1999 ; Cho et Tiedje, 2001) peut être utilisée pour suivre l'expression de gènes (Dennis et al., 2003) ou pour déterminer la diversité des gènes fonctionnels (Wu et al., 2001). Le principe de cette technique est basé sur l'utilisation d'un ensemble de molécules d'ADN de séquence connue qui se trouvent fixées sur un substrat dans un ordre connu de façon à fonctionner comme des sondes. La présence ou l'activité d'un grand nombre de gènes d'un échantillon peut être ainsi déterminé relativement rapidement. Depuis quelques années maintenant, la technique de microarray a trouvé sa place dans l'étude de la diversité fonctionnelle (Schena et al., 1998).

Parmi les techniques qui permettent d'accéder à la fois à la physiologie et à la taxonomie d'organismes non cultivables, se distinguent **les approches de métagénomique** qui sont un outil très puissant pour relier la diversité fonctionnelle à la diversité taxinomique (Fig.22). Handelsmann (2004) définit la « métagénomique » comme l'analyse génomique d'une population de microorganismes. La constitution d'un métagénome consiste en pratique à isoler de l'ADN environnemental et à le cloner directement (Fig.22). De telle manière, nous obtenons une banque de clones relative aux microorganismes présents dans l'habitat échantillonné. Cette technique permet non seulement d'éviter tous les biais inhérents à la PCR qui peuvent fausser l'image de la diversité des communautés analysées (Reysenbach et al., 1992 ; Suzuki et Giovannoni, 1996 ; van Wintzingerode et al., 1997 ; Wang et Wang, 1997), mais aussi de cloner des fragments de grande taille (> 100 kb). Ces fragments de grande taille portent souvent des informations substantielles sur la diversité taxinomique et fonctionnelle des organismes d'origine.

Les clones peuvent être criblés pour la présence de marqueurs phylogénétiques, tels que le gène codant pour le l'ARN 16S par hybridation ou par PCR multiplexes. Stein et al. (1996) ont ainsi pu caractériser des *Archaea* non cultivables. Une autre façon de traiter les clones, est de les séquencer de façon aléatoire. Ainsi, il est possible d'obtenir des informations quant à la distribution, à la redondance de certaines fonctions au niveau d'une communauté, mais aussi quant à l'organisation génomique et aux transferts horizontaux de gènes. Enfin, des gènes conférant des caractéristiques spécifiques à l'organisme d'origine (des gènes codants pour certains enzymes par exemple) peuvent aussi être recherchés (Lorenz et al., 2002). La technique de « microarray » peut également être utilisée pour rapidement identifier et caractériser un grand nombre de clones métagénomiques (Sebat et al., 2003). Deux équipes ont déjà constitué des métagénomes procaryotique de grande taille en provenance de la mer

des Sargasses (Venter et al., 2004) et d'un biofilm (Tyson et al., 2004). Les banques métagénomiques virales actuellement disponibles, se rapportent à des écosystèmes marins (Breitbart et al., 2002 ; Breitbart et al., 2003a) et à des échantillons d'origine fécale humaine et équestre (Breitbart et al., 2003b ; Cann et al., 2005a).

Enfin, un autre type d'approche métagénomique est d'identifier des clones qui expriment certaines fonctions. Pour ce faire, il est nécessaire que l'ADN inséré dans la bactérie sélectionnée pour le clonage (*E. coli*), puisse être transcrit et traduit de façon fidèle (parfois les protéines synthétisées doivent même pouvoir être secrétées). Une des limitations majeures de cet approche est le fait que tous les gènes, probablement la majorité d'entre eux d'ailleurs, ne s'expriment pas dans la cellule hôte (Handelsman, 2004).

L'application d'approches métagénomiques nous permettra d'avoir une vision plus complète de l'ensemble des gènes des microorganismes non cultivables présents dans un environnement naturel, mais aussi d'identifier certaines voies métaboliques majeures des bactéries (eubactéries et *Archaea*) présentes (DeLong, 2005). A titre d'exemple, Bèjà et al. (2000; 2001) ont pu par exemple mettre en évidence que la rhodopsine, n'était pas uniquement présente chez les *Archaea* mais également chez les  $\alpha$ -*Protéobactéries* (notamment dans le clade SAR86).

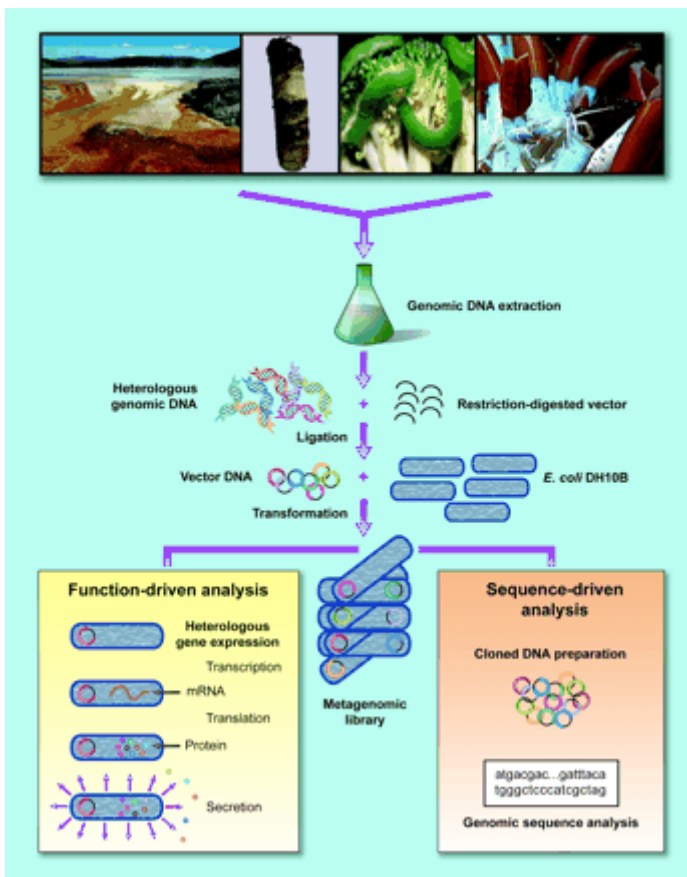


Fig.22. Construction et criblage de banques de clones métagénomiques. Représentation schématique relative à la construction de banques de clones à partir d'échantillons environnementaux. D'après Handelsman, (2004).

## **2.2. Perspectives de recherche concernant l'analyse des facteurs et processus structurant la diversité bactérienne et virale**

Alors que pour les bactéries nous commençons à avoir une idée de plus en plus précise de la biodiversité et des facteurs et processus qui peuvent influencer cette diversité, très peu d'informations sont en revanche disponibles pour les communautés virales. On peut se demander par exemple si la diversité virale est influencée par des facteurs physico-chimiques (T, oxygène, nutriments, etc.) ou si la diversité virale varie principalement en fonction de la diversité de la communauté hôte ? Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de développer à la fois des expérimentations en laboratoire, mais aussi des suivis dans le milieu naturel.

### **2.2.1. Validation des résultats sur la composition eubactérienne par une étude pluriannuelle et sur les fractions de bactéries libres et fixées**

Il apparaît tout d'abord, que nos résultats concernant la composition eubactérienne doivent être validés sur un plus grand panel d'écosystèmes aquatiques et par des études pluriannuelles. Concernant ce dernier point, nous disposons d'une série de filtres (0,2 µm) et de préfiltres (2 µm) qui ont été collectés lors de cette thèse (entre 2001-2004) à une fréquence mensuelle ou bimensuelle dans chacun des trois lacs à 2, 15, 30 et 45-50 m de profondeur. L'ADN a été extrait sur la plupart de ces filtres, mais seule une faible proportion de ces extraits a été analysée en DGGE ou par clonage-séquençage. La technique de T-RFLP ou d'ARISA pourraient être employée dans un futur très proche afin d'analyser la variabilité spatio-temporelle des eubactéries libres (analyse des filtres 0,2 µm après préfiltration) et peut être même des eubactéries fixées (analyse des filtres 2 µm). Par ailleurs, nous pouvons imaginer l'utilisation de ces filtres afin d'étudier également la variabilité spatio-temporelle de la **diversité des Archaea** qui ont été longtemps considérées comme typiques des milieux extrêmes, et qui sont maintenant reconnues comme étant une composante importante même dans des milieux non extrêmes (DeLong, 1998). Diverses études ont récemment mis en évidence leur présence dans les eaux oxygénées des écosystèmes aquatiques d'eau douce (Øvreås et al., 1997 ; Jardillier et al., 2005b) ou marines (Massana et al., 1997; Murray et al., 1998 ), notamment le lac du Bourget (Debroas, communication personnelle).

### **2.2.2. Le rayonnement UV et la turbulence peuvent-ils influencer la diversité bactérienne ?**

Une autre perspective intéressante concerne l'évaluation de l'impact relatif de deux autres facteurs physiques qui peuvent probablement affecter la diversité des communautés bactériennes pélagiques. Il s'agit du rayonnement ultraviolet et de la turbulence. Etudier les effets du rayonnement ultraviolet sur la diversité des communautés bactériennes est une thématique d'actualité si l'on considère que dans le cadre du changement global, nous nous attendons non seulement à un réchauffement global mais aussi à une augmentation du gaz carbonique, ou encore à une augmentation du rayonnement UV, notamment les UV-B) suite à la détérioration de la couche d'ozone. Nous savons que les UV peuvent être à l'origine d'effets délétères sur les communautés microbiennes, soit directement (mort, mutations, ...) soit indirectement (modification de la structure et de la composition de la matière organique dissoute) (Sommaruga, 2001 ; Jacquet et Bratbak, 2003). Les radiations dans l'ultraviolet sont susceptibles d'influencer la diversité des communautés bactériennes tout comme elles sont capables d'influencer la diversité d'autres composants des communautés microbiennes, telles que le phytoplancton et les protistes flagellés et ciliés (Davidson et Belbin, 2002). D'autre part, les travaux de Joux et al. (1999) ont mis en évidence que la sensibilité aux rayons UV-B peut largement varier d'une espèce bactérienne à une autre, ce qui suggère que ces longueurs d'ondes puissent affecter la structure d'une communauté bactérienne dans les eaux de surface. Cependant, Winter et al. (2001) ont pu montrer seulement des faibles changements dans la composition d'une communauté bactérienne. Concrètement, je suis associée à un projet visant à évaluer l'impact des UV sur la structure et le fonctionnement de la boucle microbienne (responsable : S. Jacquet, INRA Thonon).

Le second facteur concerne l'effet de la turbulence en milieu pélagique. Peters et al. (2002) ont pu démontrer que les turbulences avaient des effets sur les prédateurs des bactéries et des considérations théoriques ont montré que la turbulence peut augmenter de façon significative l'apport en nutriments pour les cellules algales de taille supérieure à 60 µm Karp-Boss et al. (1996). Sachant que les prédateurs d'une part et les algues d'autre part peuvent forger la structure d'une communauté bactérienne (Hahn et Hofle, 1999 ; Pinhassi et al., 2003; Corno, 2004), la turbulence peut avoir au moins un effet indirecte sur celle-ci. Enfin, Malits et Weinbauer (2005) suggèrent que les turbulences influencent l'activité bactérienne et virale (et donc probablement la diversité également) en influençant l'accès aux

nutriments. Pinhassi et al. (2004) au contraire, montrent que la turbulence n'a pas d'effet sur la diversité de bactéries.

### **2.2.3. Diversité bactérienne et virale au cours des proliférations de *P. rubescens***

Une autre perspective concrète consiste à étudier l'évolution de la diversité des virus et des bactéries lors des proliférations d'une espèce phytoplanctonique. L'étude des proliférations de cyanobactéries toxiques en milieu aquatique est d'un intérêt général en raison de leurs conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes et des risques sanitaires qui leur sont associés. Parmi les diverses espèces de cyanobactéries, *Planktothrix rubescens*, pose de sérieux problèmes d'ordre sanitaire aux gestionnaires du lac du Bourget (Freissinet et al., 2004 ; Jacquet et al., 2005a) surtout à cause de la présence d'une toxine hépatotoxique (microcystine) qui est libérée lors de la lyse cellulaire (Feuillade, 1992 ; Carmichael et Falconer, 1993 ; Chorus et al., 2000 ; Fromme et al., 2000 ; Briand et al., 2005). Des fortes concentrations de cette cyanobactérie sont enregistrées surtout au niveau du métalimnion pendant la période de stratification des eaux, alors qu'en hiver lors du brassage des eaux, on observe des concentrations en *P. rubescens* distribuées de façon homogène le long de la colonne d'eau (Dokulil et Teubner, 2000; Salmaso, 2000 ; Freissinet et al., 2004 ). Des questions restent ouvertes concernant notamment le déterminisme du déclin du bloom. On peut se demander également s'il y a des changements dans la diversité des bactéries et virus associés aux différentes phases du bloom. Enfin, les cyanophages sont des virus à cyanobactéries et en tant que tels, ils peuvent exercer un control selon la théorie « killing the winner » (Thingstad et Lignell, 1997) sur les populations de cyanobactéries qui sont présentes en fortes concentrations (Padan et Shilo, 1973 ; Suttle, 2000a). Le rôle des virus dans le déclin de blooms a été montré par exemple par van Hannen et al. (1999) dans le cas de deux cyanobactéries filamenteuses (*Prochlorotrix hollandica* et *Oscillatoria* c.f. *limnetica*). Quant aux bactéries hétérotrophes, elles jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique, notamment du COD libéré lors de la photosynthèse par les cyanobactéries (Cole et al., 1982). Un changement de la qualité et de la quantité du COD au cours de proliférations phytoplanctoniques, a été montré par Sondergaard et al. (2000) et ce changement pourrait avoir un effet sur la composition des communautés bactériennes. Par ailleurs, il a été mis en évidence que des exudats de cyanobactéries peuvent avoir un effet bactéricide (Østensvik et al., 1998). D'autre part, les bactéries interviennent dans la dégradation de cellules mortes et probablement aussi des toxines de cyanobactéries. Concernant ce dernier point, la dégradation de microcystines (toxine de *P. rubescens*) a été étudiée par plusieurs auteurs (Jones et al.,



1994 ; Bourne et al., 1996 ; Park et al., 2001; Christoffersen et al., 2002 ). Enfin, il a été montré que certaines bactéries peuvent avoir des effets positifs, nuls ou négatifs ou sur la croissance de cyanobactéries (Casamatta et C.E., 2000; Salomon et al., 2003 ). Enfin, il a été démontré, que des bactéries peuvent avoir un effet algicide (Lovejoy et al., 1998 ; Manage et al., 2000 ; Rashidan et Bird, 2000) et jouer ainsi un rôle dans le déclin des blooms phytoplanctoniques.

Il est donc probable que pendant les différentes phases d'une prolifération de cyanobactéries, des modifications interviennent dans la composition des communautés bactériennes et virales. Deux perspectives de travail intéressantes me semblent pouvoir être proposées sur ce thème. La première concerne un suivi de la dynamique et de la diversité des différents composants biologiques (bactéries, virus et cyanobactéries) *in situ* (lac du Bourget) alors que la seconde repose sur une approche en laboratoire.

Concernant le suivi *in situ*, les résultats de nos travaux de recherche présentés dans cette thèse, n'ont pas pu mettre en évidence de liens directs entre la dynamique des blooms de *P. rubescens* et la dynamique et diversité des populations virales ou bactériennes. Toutefois, notre étude comparative s'est limitée à un nombre relativement faible d'échantillons et à une période où peu d'échantillons étaient caractérisés par des fortes concentrations en *P. rubescens*. Il serait donc intéressant de suivre la diversité et la dynamique des populations de cyanophages et des populations bactériennes, en parallèle à la diversité et dynamique des populations de *P. rubescens* dans les diverses phases d'une prolifération. La technique de T-RFLP pourrait être utilisée afin de déterminer la diversité eubactérienne (Liu et al., 1997b) et des cyanophages (Wang et Chen, 2004).

Concernant l'approche expérimentale, j'ai pu conduire durant cette thèse une première expérimentation au cours de laquelle trois réplicats d'une culture de *P. rubescens* du lac du Bourget ont été étudiés. Des comptages de l'abondance des virus, des bactéries hétérotrophes ont été effectués à des intervalles de temps réguliers, par cytométrie en flux, alors que la concentration en cellules de *P. rubescens* a été déterminée par spectrophotométrie à 570 nm (pic d'absorbance du pigment accessoire : la phycoérythrine). Des filtres de 2 µm et 0,2 µm ont été collectés aux mêmes intervalles de temps afin de déterminer par DGGE ou T-RFLP, la diversité des eubactéries libres ou fixées, associées aux différentes phases de croissance de la cyanobactérie. Les premiers résultats obtenus semblent révéler des changements importants dans la composition de la communauté bactérienne à la fin de la phase stationnaire de la cyanobactérie.

#### **2.2.4. Analyse métagénomique d'ADN virale dans des écosystèmes d'eau douce**

Pour appréhender la diversité de la communauté virale dans un grand lac, il est nécessaire de développer une approche métagénomique s'affranchissant de la PCR. En effet, en raison d'absence d'un gène marqueur « universel », nous ne pouvons appréhender qu'une faible proportion de la diversité de cette communauté (les cyanophages, les virus à eucaryotes, etc.). Ce travail me semble particulièrement intéressant, car aucune analyse métagénomique virale sur un échantillon naturel d'eau douce n'a été effectuée à ce jour. Les résultats d'une telle approche permettrait entre autres de constituer une banque de séquences utilisables par la suite pour définir de nouvelles amorces pour le suivi de populations virales.

### **2.3. Perspectives concernant les relations biodiversité et fonctionnement/stabilité d'un écosystème**

L'étude des relations entre richesse spécifique et richesse fonctionnelle des écosystèmes constitue un enjeu scientifique de première importance pour les prochaines années (Loreau et al., 2002; article V) et ce, d'autant plus dans le contexte global de perte de biodiversité. D'une façon globale, l'évaluation de la relation entre biodiversité et productivité et stabilité d'un écosystème nous intéresse particulièrement.

#### **2.3.1. Analyse métagénomique d'ADN procaryotique (eubactéries et *Archaea*) dans un des trois lacs étudiés (Bourget, Annecy ou Léman)**

Une perspective de travail qui aura comme objectif d'évaluer les relations entre biodiversité et fonctionnement, concerne la constitution d'une banque métagénomique d'ADN procaryotique (*Archaea* et eubactéries) en provenance de l'un des trois lacs (Annecy, Bourget ou Léman) étudiés au cours de cette thèse. Un projet a d'ailleurs été déposé conjointement par l'INRA Thonon (J.F. Humbert) et l'Université de Clermont-Ferrand (D. Debros) sur cette thématique. Ce travail permettrait en premier lieu de confronter l'inventaire spécifique obtenu lors de cette thèse après amplification d'un fragment d'ARNr 16S (article III) à une estimation basée sur une méthode ne nécessitant pas de PCR. Les résultats issus de l'article III nous ont indiqué non seulement la prédominance d'eubactéries spécifiques aux écosystèmes d'eau douce mais aussi qu'une partie substantielle des eubactéries de ces écosystèmes n'ont pour le moment aucun représentant proche cultivé. La constitution d'une banque métagénomique pourrait surtout nous renseigner sur le **rôle fonctionnel des eubactéries et des *Archaea***, sans passer par une étape (sélective et limitante) de mise en

culture (voir sous-chapitre V.2.1.). Les informations d'une analyse métagénomique nous permettraient par exemple d'évaluer le **degré de redondance fonctionnelle** dans ces communautés. Si celle-ci est élevée, cela peut signifier que ces communautés microbiennes ont un pouvoir élevé de résistance (capacité à résister à une perturbation) mais aussi de résilience (aptitude à retrouver son état originel après perturbation) en cas de perturbations.

### **2.3.2. Etudier la distribution spatio-temporelle des gènes impliqués dans le cycle de l'azote (ou de carbone) dans un milieu aquatique et quantifier les impacts de divers perturbations sur leur fonctionnement**

Si l'on considère l'importance des microorganismes dans les flux de matière et d'énergie dans la biosphère et leur rôle central dans le fonctionnement des écosystèmes, il nous semble pertinent de nous intéresser à des groupes fonctionnels particuliers, comme ceux impliqués par exemple dans les grands cycles de matière, tels que le cycle de l'azote et le cycle de carbone. Il me semblerait ainsi particulièrement pertinent d'étudier la présence, l'abondance et l'expression des gènes de fonctions impliqués dans ces deux grands cycles. Concernant le cycle de l'azote, les groupes fonctionnels importants se classent dans deux grandes catégories : les nitrifiants et les dénitrifiants. Les gènes clefs impliqués sont par exemple la nitrate réductase et la nitrite oxydoréductase. Ainsi, par le biais de la PCR en temps réel nous pourrions étudier les variations spatio-temporelles dans la distribution des groupes microbiens et également quantifier les impacts de diverses perturbations sur les fonctions assurées. Des exemples d'applications de la PCR en temps réel pour améliorer nos connaissances sur le cycle de l'azote concernent par exemple l'étude de bactéries responsables de l'oxydation de l'ammonium dans le sol (Hermansson et Lindgren, 2001), l'étude des bactéries nitrifiantes dans des eaux d'une station d'épuration (Harms et al., 2003) et l'étude de bactéries dénitrifiantes dans la mer baltique (Labrenz et al., 2004). Nous pouvons imaginer de **mesurer le degré de redondance fonctionnelle** en effectuant des expérimentations en laboratoire qui prévoient la réduction, dans l'échantillon naturel, du nombre d'espèces par le biais d'une dilution sériée. Cette méthode est conseillée par Giller et al. (2004) afin de reproduire les pertes d'espèces dans un milieu naturel. En milieu naturel, l'espèce la moins abondante sera la plus fragile et disparaîtra probablement la première. L'impact de ces pertes de diversité taxinomique sur le fonctionnement de chaque communauté dans chaque série testée, est ensuite mesuré par exemple en regard des capacités de nitrification, de minéralisation du carbone organique etc. Si la perte de diversité taxinomique ne s'accompagne pas d'une perte de diversité fonctionnelle, nous pouvons alors

en déduire un haut degré de redondance fonctionnel. La méthode de dilution a été appliquée par Wertz et al. (2005) afin de caractériser l'impact d'une diminution de la diversité sur trois groupes microbiens fonctionnelles présents dans un sol (les hétérotrophes, les dénitrifiants et la communauté responsable de l'oxydation de l'ammonium). Leurs résultats montrent, qu'en dépit d'une réduction de la richesse spécifique dans ces trois groupes, le fonctionnement n'a pas été perturbé, ce qui montre un haut degré de redondance fonctionnelle au sein de ces groupes.

Nous pouvons également mesurer le **degré de résistance et de résilience** d'une communauté naturelle face à une perturbation. La communauté d'origine subira une dilution sériée et chaque niveau de dilution sera exposée à une perturbation. Des mesures de diversité fonctionnelle (*ex.* : respiration, nitrification) et des mesures de diversité taxonomique effectuées avant la perturbation, au moment de la perturbation et un temps suffisamment long après la perturbation, nous renseigneront sur le degré de résistance puis de résilience des communautés. Ce genre d'approche a été utilisé par Leroux et al. (2005) sur trois groupes fonctionnels d'un sol (les hétérotrophes, les dénitrifiants et les bactéries responsable de l'oxydation d'ammonium).

**En conclusion :**

**Mieux comprendre, voir prédire, les effets de changements de la biodiversité (perte d'espèces et invasion d'espèces) sur le fonctionnement d'un écosystème, devient aujourd'hui critique, compte tenu de l'influence croissante des activités humaines sur les écosystèmes naturels (Vitousek et al., 1997), et compte tenu des services et produits que l'homme reçoit de ces derniers (Dailey et al., 2000). Il me semble que c'est en multipliant les approches sur des modèles divers que nous parviendrons à cela.**

**Cependant, il est nécessaire de réaliser en parallèle à ces expérimentations, des approches *in silico* qui demanderont tout d'abord un effort de conceptualisation des résultats déjà acquis mais qui permettront aussi de tester des scénarii évolutifs différents. La modélisation mathématique a déjà montré qu'elle était d'une importance fondamentale pour permettre la progression des concepts et des connaissances sur les relations existant entre biodiversité et fonctionnement des écosystèmes.**

**La réelle intégration des suivis de terrain, d'expérimentations en laboratoire et de la modélisation me semble être une des clés qui permettra, dans le futur, de faire progresser d'une façon décisive, nos connaissances sur ces processus très complexes et leurs interactions.**



## REFERENCES CITEES

(exceptées celles des articles)

**A**

- Acinas, S. G., Anton, J. et Rodriguez-Valera, F., (1999). Diversity of free-living and attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Envir. Microbiol.* **65**: 514-522.
- Acinas, S. G., Rodriguez-Valera, F. et Pedros-Alio, C., (1997). Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microb. Ecol.* **24**: 27-40.
- Ackermann, H. W., (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* **146**: 843-857.
- Ackermann, H. W., (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* **154**: 245-251.
- Ackermann, H. W. et Krisch, H. M., (1997). A catalogue of T4-type bacteriophages. *Arch. Virol.* **142**: 2329-2345.
- Allredge, A. L., Passow, U. et Logan, B. E., (1993). The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep Sea Res.* **40**: 1131-1140.
- Amann, R. I., Ludwig, W. et Schleifer, K.-H., (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**(1): 143-169.
- Angly, F., Rodriguez-Brito, B., Bangor, D., McNairnie, P., Breitbart, M., Salamon, P., Felts, B., Nulton, J., Mahaffay, J. M. et Rohwer, F., (2005). PHACCS, an online tool for estimating the structure and diversity of uncultured viral communities using metagenomic information. *BMC Bioinformatics* **6**(41): 1-9.
- Anneville, O. (2001). Diagnostic sur l'évolution de l'état écologique du Léman par l'analyse des séries chronologiques du phytoplancton. Lyon, Université Claude-Bernard-Lyon I: 268.
- Anton, J., Rossello-Mora, R., Rodriguez-Valera, F. et Amann, R., (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(7): 3052-3057.

- Armstrong, R. A. et McGhee, R., (1976). Coexistence of species competing for shared resources. *Theor. Pop. Ecol.* **9**: 317-328.
- Atlas, R. M., Saylor, G., Burlage, R. S. et Bej, A. K., (1992). Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *Biotechniques* **12**: 706-717.
- Autio, R. M., (1992). Temperature regulation of brackish water bacterioplankton. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.* **37**: 253-263.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. et Thingstad, F., (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257-263.

## B

- Baas-Beckings, L. G. M., (1934). *Geologie of Inleiding tot de Milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stokum.
- Baker, B. J. et Banfield, J. F., (2003). Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microb. Ecol.* **44**: 139-152.
- Barnett, T. P., Pierce, D. W. et Schnur, R., (2001). Detection of anthropogenic climate change in the world's ocean. *Science* **292**: 270-274.
- Béjà, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N. et DeLong, E. F., (2000). Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**: 1902-1906.
- Béjà, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M. et DeLong, E. F., (2001). Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* **411**: 786-789.
- Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F. et Martinez-Murcia, A. J., (1995). Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microb. Ecol.* **18**: 267-280.
- Berard, A., Dorigo, U., Mercier, I., Becker van-Slooten, K., D., G. et Leboulanger, C., (2003). Comparison of the ecotoxicological impact of triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* **53**: 935-944.
- Bérard, A., Volat, B. et Montuelle, B., (1995). Bacterial activity and its trophic role in a eutrophic pond. *Arch. Hydrobiol.* **134**(4): 499-513.

- Bergh, O., Borsheim, K. Y., Bratbak, G. et Heldal, M., (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467-468.
- Bergström, A.-K. et Jansson, M., (2000). Bacterioplankton production in humic lake Ortrasket in relation to input of bacterial cells and input of allochthonous organic carbon. *Microb. Ecol.***39**: 101-115.
- Bernard, L., Schäfer, H., Joux, F., Courties, C., Muyzer, G. et Lebaron, P., (2000). Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquat. Microb.Ecol.* **23**: 1-11.
- Berninger, U.-G., (1991). Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnol. Oceanogr.* **36**(1): 139-147.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Carrias, J. F. et Portelli, C., (2003a). Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophic. *Freshwater Biol.* **48**: 810-822.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Bouvy, M., Arfi, R. et Amblard, C., (2005). Low consumption of virus-sized particles by heterotrophic nanoflagellates in two lakes of the French Massif Central. *Aquat. Microb. Ecol.* **39**: 205-209.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Carrias, J. F., Sargos, D., Garabétian, F. et Lavandier, P., (2003b). Viral lysis, flagellate grazing potential, and bacterial production in lake Pavin. *Microb. Ecol.***45**: 119-127.
- Bidle, K. D. et Fletcher, M., (1995). Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(3): 944-952.
- Billen, G. (1984). Heterotrophic utilization and regeneration of nitrogen. Heterotrophic activity in sea. J. E. Hobbie et D. A. Williams. New York, Plenum Press. **1**: 313-355.
- Boehme, J., Frisher, M. E., Jiang, S. C., Kellogg, C. A., Pichard, S., Rose, J. B., Steinway, C. et Paul, J. H., (1993). Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **97**: 1-10.
- Bohannon, B. J. M. et Hughes, J., (2003). New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Curr.Op.Microbiol.***6**: 282-287.
- Bohannon, B. J. M. et Lensky, R. E., (2000). Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecol.Letters* **3**: 362-377.



- Borics, e. a., (2000). Phytoplankton associations under changing pattern of bottom-up vs. top-down control in a small hypertrophic fishpond in East Hungary. *Hydrobiol.* **424**: 79-90.
- Bosshard, P. P., Stettler, R. et Bachofen, R., (2000). Seasonal and spatial community dynamics in the meromictic lake Cadagno. *Arch. of Microbiol.* **174**: 168-174.
- Bourne, D. G., Jones, G. J., Blakeley, R. L., Jones, A., Negri, A. P. et Riddles, P., (1996). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4086-4094.
- Brachvogel, T., Schweitzer, B. et Simon, M., (2001). Dynamics and bacterial colonization of microaggregates in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **26**: 23-35.
- Bratbak, G. et Heldal, M. (1995). Viruses-the new players in the game; their ecological role and could they mediate genetic exchange by transduction? NATO ASI Series. I. Joint. Berlin Heidelberg, Springer Verlag. **38**: 249-264.
- Bratbak, G., Heldal, M. et Norland, S., (1990). Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Envir. Microbiol.* **56**: 1400-1405.
- Bratbak, G., Thingstad, F. et Heldalm, (1994). Viruses and the microbial loop. *Microb. Ecol.* **28**: 209-221.
- Breitbart, M., Felts, B., Kelley, S., Mahaffay, J. M., Nulton, J., Salamon, P. et Rohwer, F., (2003a). Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Proc. R. Soc. Lond.* **271**: 565-574.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P. et Rohwer, F., (2003b). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* **185**(20): 6220-6223.
- Breitbart, M., Miyake, J. H. et Rohwer, F., (2004a). Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences. *FEMS Microb. Letters* **236**: 249-256.
- Breitbart, M. et Rohwer, F., (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology* **13**(6): 278-284.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J. M., Segall, A. M., Mead, D., Azam, F. et Rohwer, F., (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *PNAS* **99**(22): 14250-14255.
- Breitbart, M., Wegley, M., Leeds, S., Schoenfeld, T. et Rohwer, F., (2004b). Phage community dynamics in hot springs. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(3): 1633-1640.
- Briand, J. F., Jacquet, S., Flinois, C., Avois-Jacquet, C., Maissonnette, C., Leberre, B. et Humbert, J.-F., (2005). Variations in the microcystin production of *Planktothrix*

- rubescens* (cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb. Ecol.* **sous presse**.
- Briand, J. F., Leboulanger, C. et Humbert, J.-F., (2004). *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.* **40**(231-238).
- Brock, T. D., (1987). The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **41**: 1-17.
- Brock, T. D., (1997). The value of basic research: Discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics* **146**: 1207-1210.
- Bruce, K. D., Osborn, A. M., Pearson, A. J., Strike, P. et Ritchie, D. A., (1995). Genetic diversity within mer genes directly amplified from communities of noncultivated soil and sediment bacteria. *Mol. Ecol.* **4**: 605-612.
- Bruessow, H. et Hendrix, R. W., (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell.* Vol. **108**: 13-16.
- Bruns, A., Nubel, U., Cypionka, H. et Overmann, J., (2003). Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 1980-1989.
- Brussaard, C. P. D., Kempers, R. S., Kop, A. J., Riegman, R. et Heldal, M., (1996). Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliana huxleyi* in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 105-113.
- Brussard, C., Short, S. M., Frederickson, C. M. et Suttle, C. A., (2004). Isolation and phylogenetic analysis of novel viruses infecting the phytoplankton *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(6): 3700-3705.
- Brussard, C. P. D., (2004). Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(3): 1506-1513.
- Brussard, C. P. D., Marie, D. et Bratbak, G., (2000). Flow cytometry detection of viruses. *J. Virological Methods* **85**: 175-182.
- Buckling, A. et Rainey, P. B., (2002). Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc. R. Soc. Lond.* **269**: 931-936.
- Bull, A. T., Goddellow, M. et Slater, J. H., (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 219-252.
- Burkert, U., Warnecke, F., Babenzien, D., Zwirnmann, E. et Pernthaler, J., (2003). Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6550-6559.

## C

- Cann, A. J., Fandric, S. E. et Heaphy, S., (2005a). Analysis of the Virus Population Present in Equine Faeces Indicates the Presence of Hundreds of Uncharacterized Virus Genomes. *Virus Genes* **30**(2): 151 - 156.
- Cann, A. J., Fandrich, S. E. et Heaphy, S., (2005b). Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. *Virus Genes* **30**(2): 151-156.
- Carmichael, W. W. et Falconer, I. R. (1993). Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. London.
- Caron, D. A., Davis, P. G., Madin, L. P. et Sieburth, J. M., (1982). Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *Science* **218**: 795-797.
- Caron, D. A., Goldman, D. et Dennett, M. R., (1988). Experimental demonstration of the roles of bacteria and bacterivorous protozoa in plankton nutrient cycles. *Hydrobiol.* **159**: 27-40.
- Casamatta, D. A. et C.E., W., (2000). Sensitivity of two disjunct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing. *Microb. Ecol.* **41**: 64-73.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodriguez-Valera, F. et Pedrós-Alió, C., (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Env. Microbiol.* **4**: 297.291-297.211.
- Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Aliós, C. et Muyzer, G., (2000). Identification of spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2): 499-508.
- Chapin III, S. F., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D. U., Lavorel, S., Sala, O. E., Hobbie, S. E., Mack, M. C. et Diaz, S., (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature* **405**: 234-241.
- Chen, F., Lu, J.-R., Binder, B. J., Liu, Y.-C. et Hodson, E. R., (2001). Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 539-545.

- Chen, F. et Suttle, C. A., (1996). Evolutionary relationships among large double-stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes. *Virology* **219**: 170-178.
- Chen, F., Suttle, C. A. et Short, S. M., (1996). Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(8): 2869-2874.
- Chiura, H. X., (1997). Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* **13**: 75-83.
- Cho, B. C. et Azam, F., (1988). Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* **332**: 441-443.
- Cho, J.-C. et Giovannoni, S. J., (2004). Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine *Gammaproteobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(1): 432-440.
- Cho, J.-C. et Tiedje, J. M., (2000). Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(12): 5448-5456.
- Cho, J.-C. et Tiedje, J. M., (2001). Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(8): 3677-3682.
- Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J. et Bartram, J., (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicologie and Environmental Health, Part B* **3**: 323-347.
- Christoffersen, K., (1996). Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* **35**(6): 42-50.
- Christoffersen, K., Lyck, S. et Windings, A., (2002). Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 125-136.
- Cochlan, W. P., Wikner, J., Steward, G. F., Smith, D. C. et Azam, F., (1993). Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in nerctic, oceanic, and estuarine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **92**: 77-87.
- Cole, J. J., Likens, G. E. et Strayer, D. L., (1982). Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 1080-1090.
- Colwell, R. K. et Coddington, J. A., (1994). Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **345**: 101-118.

- Colwell, R. K., Xuano Mao, C. et Chang, J., (2004). Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* **85**(10): 2717-2727.
- Comte, J., Jacquet, S., Viboud, S., Fontvieille, D., Paolini, G. et Domaizon, I., (2005). Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget, February to July 2002). *Microb. Ecol.* (in press).
- Connell, J. H., (1978). Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science* **199**: 1302-1310.
- Connon, S. A. et Giovannoni, S. J., (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(8): 3878-3885.
- Corno, G. (2004). Bacteria-protzoan interactions and the underlying mechanisms of grazing-resistance in aquatic bacteria. Dottorato in Ecologia. Parma, Università degli Studi di Parma: 1-97.
- Corre, E. (2000). Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers: 237.
- Cottrell, M. T. et Kirchman, D., (2000). Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the *Cytophage-Flavobacteria* cluster consuming low- and high- molecular dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1692-1697.
- Cottrell, M. T. et Suttle, C. A., (1995). Wide-spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan, eukaryotic marine phytoplankter, *Micromonas pusilla*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **78**: 1-9.
- Covert, J. S. et Moran, M. A., (2001). Molecular characterization of estuarine bacterial communities that use high- and low-molecular weight fractions of dissolved organic carbon. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**: 127-139.
- Coyne, M. S., (1999). Soil microbiology: an exploratory approach. Albany, N.Y.: International Thomson Publishing.
- Crump, B. C., Armbrust, V. E. et Baross, J. A., (1999). Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7): 3192-3204.
- Crump, B. C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L. et Hobbie, J. E., (2004). Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(3): 1494-1505.

- Crump, B. C., Kling, G. W., Bahr, M. et Hobbie, J. E., (2003). Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 2253-2268.
- Curtis, T. P. et Sloan, W. T., (2004). Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 221-226.

## D

- da Silva, P. et Nahas, E., (2002). Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. *Brazilian Journal of Microbiology* **33**(4): 304-310.
- Dailey, G. C., Soderqvist, T., Arrow, K. et al., e., (2000). The value of nature and the nature of value. *Science* **289**: 395-396.
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K.-H. et Wagner, M., (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(11): 5273-5284.
- Davidson, A. et Belbin, L., (2002). Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on the marine microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 159-174.
- Davison, J., (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.
- DeFlaun, M., Paul, J. H. et Davis, D., (1986). Simplified method for dissolved DNA determination in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 654-659.
- DeFlaun, M., Paul, J. H. et Jeffrey, W. H., (1987). Distribution and molecular weight of dissolved DNA in subtropical estuarine and oceanic environments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **38**(65-73).
- Degens, B. P., (1998). Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1989-2000.
- Del Giorgio, P. A. et Duarte, C. M., (2002). Respiration in the open ocean. *Nature* **420**: 379-384.
- DeLong, E. F. (1992). *Archaea* in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (12) 5685-5689

- DeLong, E. F., (1998). Everything in moderation: *Archaea* as "non-extremophiles". *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 649-654.
- DeLong, E. F., (2005). Microbial community genomics in the ocean. *Nature Publishing Group* **3**: 459-469.
- DeLong, E. F., Franks, D. G. et Alldredge, A. L., (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.* **38**: 924-934.
- Demuth, J., Neve, H. et Witzel, K. P., (1993). Direct electron microscopic study on the morphological diversity of bacteriophage populations in lake Plußsee. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3378-3384.
- Dennis, P., Edward, E. A., Liss, S. N. et Fulthorpe, R., (2003). Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2): 769-778.
- Dionisis, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. et Sayler, G. S., (2003). Power analysis for real-time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6597-6604.
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haak, S. K. et Pace, N. R., (1998). Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10): 3869-2877.
- Dokulil, M. T. et Teubner, K., (2000). Cyanobacterial dominances in lakes. *Hydrobiol.* **438**: 1-12.
- Domaizon, I., Viboud, S. et Fontvieille, D., (2003a). Taxon specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy - Importance of mixotrophy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 317-329.
- Domaizon, I., Viboud, S. et Fontvieille, D., (2003b). Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 317-329.
- Dominik, K. et Höfle, M. G., (2002). Changes in bacterioplankton community structure and activity with depth in a eutrophic lake as revealed by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(7): 3606-3613.
- Dorigo, U., Bérard, A. et Humbert, J.-F., (2002). Comparison of Eukaryotic Phytobenthic Community composition in a Polluted River by Partial 18S rRNA Gene Cloning and Sequencing. *Microb. Ecol.* **4**: 372-380.

- Dorigo, U., Bourrain, X., A., B. et Leboulanger, C., (2003). Seasonal changes in river microalgae sensitivity to atrazine and isoproturon, along a contamination gradient. *The Science of the Total Environment* **318**: 101-114.
- Dufour, P. et Colon, M., (1992). The tetrazolium reduction method for assessing the viability of individual bacterial cells in aquatic environments : improvements, performance and applications. *Hydrobiol.* **232**(433): 211-218.
- Duhamel, S. et Jacquet, S., (2005). Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J. Microbiol. Methods.* **in press**.
- Dumont, M. G. et Murrell, J. C., (2005). Stable isotope probing- linking microbial identity to function. *Nature Rev. Microbiol.*, AOP: 1-6.
- Dykhuizen, D. E. (1998). Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *A. v. Leeuwenhoek.* **73**: 25-33.

## E

- Edwards, R. A. et Rohwer, F., (2005). Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, AOP **10 Mai**: 6-12.
- Eiler, A. et Bertilsson, S., (2004). Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmen. Microbiol.* **6**(12): 1228-1243.
- Eiler, A., Langenheder, S., Bertilsson, S. et Tranvik, L. J., (2003). Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(7): 3701-3709.
- Eilers, H., Pernthaler, J. et Amann, R., (2000a). Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(11): 4634-4640.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F. O. et Amann, R. I., (2000b). Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(7): 3044-3051.
- Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G. et Mohn, W. W., (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from Northern Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(1): 275-284.



Etien, S. (2005). Etude de la structure et de la dynamique des Archaea planctoniques dans un lac mésotrophe (lac du Bourget, Savoie). Université Blaise Pascal-Clermont II. Clermont Ferrand.

## F

Fandino, L. B., Riemann, L., Steward, G. F., Long, R. A. et Azam, F., (2001). Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**: 119-130.

Farnell-Jackson, E. A. et Ward, A. K., (2003). Seasonal patterns of viruses, bacteria and dissolved organic carbon in a rivering wetland. *Freshwat. Biol.* **48**: 841-851.

Fenchel, T., (1982). Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as consumers of bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **9**: 35-42.

Ferris, M. J., Muyzer, G. et Ward, D. M., (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined population inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2): 340-346.

Ferris, M. J. et Ward, D. M., (1997). Seasonal distribution of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1375-1381.

Feuillade, J., (1992). Les toxines des cyanobactéries: revue de synthèse. *Revue des Sciences de l'Eau* **5**: 489-508.

Fiedler, H. P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goddfellow, M., Potterat, O. et Mihm, G., (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 37-42.

Finlay, B. J., (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science Environ. Microbiol.* **296**: 1061-1063.

Fischer, U. R. et Velimirov, B., (2002). High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquatic Microbial Ecol.* **27**: 1-12.

Fisher, M. et Triplett, E. W., (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(10): 4630-4636.

Fisher, M. M., Klug, J. L., Lauster, G., Newton, M. et Triplett, E. W., (2000). Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microbial Ecol.* **40**: 125-138.

- Floeder, S. et Sommer, U., (1999). Diversity in planktonic communities: an experimental test of the intermediate disturbance hypothesis. *Limnol. Oceanogr.* **44**(4): 1114-1119.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. et Jurtshuk, P. J., (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International J. System. Evol. Microbiol.* **42**(166-170).
- Frederickson, C. M., Short, S. M. et Suttle, C. A., (2003). The physical environment affects cyanophage communities in British Columbia inlets. *Microbial Ecol.* **46**: 348-357.
- Freissinet, C., Cabal, A., Bertrand, O., Humbert, J. F., Jacquet, S., Groleau, A., Prevot, F., Sarazin, G., Tassin, B. et Vinçon-Leite, B. (2004). Sacytox. Prototype de système d'alerte pour les proliférations de cyanobactéries toxiques dans les lacs: diagnostic et prévision. Ministère de l'Ecologie et du Développement durable, réseau riteau.: 193.
- Fromme, H., Köhler, A., Krause, R. et Führling, D., (2000). Occurrence of cyanobacterial toxins-microcystins and anatoxin-a- in Berlin water bodies with implication to human health and regulations. *Environ.Toxicol.* **15**(2): 120-130.
- Fuhrman, J. A., (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541-547.
- Fuhrman, J. A. et Schwalbach, M., (2003). Viral influence on aquatic bacterial communities. *Biol. Bull.* **204**: 192-195.
- Fuhrman, J. A., Sleeter, T. D., Carlson, C. A. et Proctor, L. M., (1989). Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **57**: 207-218.
- Fuhrman, J. A. et Suttle, C. A., (1993). Viruses in marine planktonic systems. *Oceanogr.* **6**(2): 51-63.
- Fuller, N. J., Wilson, W. H., Joint, I. et Mann, N. H., (1998). Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(6): 2051-2060.
- Fulthorpe, R. R., Rhodes, A. N. et Tiedje, J. M., (1998). High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* **64**: 1620-1627.

## G

- Garvey, P., Hill, C. et Fitzgerald, G. F., (1996). The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2): 676-679.

- Gibson, U. E., Heid, C. A. et Williams, P. M., (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**(10): 995-1001.
- Giller, P. S., Hillebrand, H., Berninger, U.-G., Gessner, M. O., Hawkins, S., Inchausti, P., Inglis, C., Leslie, H., Malmqvist, B., Monaghan, M. T., Morin, P. J. et O'Mullan, G., (2004). Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *OIKOS* **104**: 423-436.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. et Field, K. G., (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **344**: 60-63.
- Giovannoni, S. J. et Rappé, M., Eds. (2000). Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. *Microbial Ecology of the Oceans*, Wiley Series in Ecology and applied microbiology Ralph Mitchell, Series Editor.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. et Amann, R., (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(8): 3721-3726.
- Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A. et Amann, R., (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(11): 5053-5065.
- Gons, H. J., Ebert, J., Hoogveld, H. L., van den Hove, L., Pel, R., Takkenberg, W. et Woldringh, C. J., (2002). Observations on cyanobacterial populations collapse in eutrophic lake water. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 319-326.
- Goodfellow, E. et Williams, S. T., (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 189-216.
- Gorick, R. et Welschmeyer, N. A., (1993). The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research* **40**: 2283-2294.
- Gray, N. D., Howarth, R., Pickup, R., Gwyn Jones, J. et Head, I. M., (2000). Use of combined microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization to determine carbon metabolism in mixed natural communities of uncultured bacteria from the genus *Achromatium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(10): 4518-4522.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. et Bailey, M. J., (2003). Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(12): 6961-6968.

- Gugger, M., Molica, R., Le Berre, B., Dufour, P., Bernard, C. et Humbert, J.-F., (2005). Genetic Diversity of *Cylindrospermopsis* Strains (Cyanobacteria) Isolated from Four Continents. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(2): 1097-1100.
- Guixa-Boixereu, N., Lysnes, K. et Pedrós-Alió, C., (1999). Viral lysis and bacterivory during a phytoplankton bloom in a coastal water microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(5): 1949-1958.

## H

- Hahn, M. W., (2003). Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(9): 5248-5254.
- Hahn, M. W. et Hofle, M. G., (1999). Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(11): 4863-4872.
- Hahn, M. W. et Hofle, M. G., (2001). Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. Minireview. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 113-121.
- Hahn, M. W., Lunsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Hofle, M. G., Boenigk, J. et Stadtler, P., (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(3): 1442-1451.
- Handelsman, J., (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(4): 669-685.
- Hara, S., Terauchi, K. et Koike, I., (1991). Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(9): 2731-2734.
- Hardin, G., (1960). The competitive exclusion principle. *Science* **131**: 1292-1298.
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. et Sayler, G. S., (2003). Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol.* **37**(2): 343-351.
- Harper, J. L. et Hawksworth, D. L. (1995). Preface. Biodiversity measurement and estimation. D. L. Hawksworth. London, U.K., Chapman and Hall.

- Head, I. M., Saunders, J. R. et Pickup, R., (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecol.* **35**: 1-21.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. et Williams, P. M., (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**: 986-994.
- Hennes, K. P. et Suttle, C. A., (1995). Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.* **40**(6): 1050-1055.
- Hermansson, A. et Lindgren, P.-E., (2001). Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 972-976.
- Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A. et Zehr, J. P., (1997). Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7): 2957-2960.
- Hobbie, J. E., Daley, R. J. et Jasper, S., (1977). Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**(5): 1225-1228.
- Hofle, M. G. et Brettar, I., (1995). Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in the water column of the central Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 868-874.
- Höfle, M. G., Haas, H. et Dominik, K., (1999). Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7): 3164-3174.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. et Gelfan, D. H., (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **88**: 7276-7280.
- Hollibaugh, J. T., Wong, P. S. et Murrell, M. C., (2000). Similarities of particle-associated and free-living bacterial communities in northern San Francisco Bay, California. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**: 103-114.
- Honda, D., Yokota, A. et Sugiyama, J., (1999). Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Evol.* **48**: 723-739.
- Hooper, D. U. et Vitousek, P. M., (1997). The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* **277**: 1302-1305.

- Hoppe, H. G., Ducklow, H. W. et Karrasch, B., (1993). Evidence for dependency of bacterial growth on enzymatic hydrolysis of particulate organic matter in the mesopelagic ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **93**: 277-283.
- Horner-Devine, C., Carney, K. M. et Bohannon, B. J. M., (2003a). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. Lond.* **271**: 113-122.
- Horner-Devine, C., Lage, M., Hughes, D. J. et Bohannon, B. J. M., (2004). A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432**: 750-753.
- Horner-Devine, C., Leibold, M. A., Smith, V. H. et Bohannon, B. J. M., (2003b). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Letters* **6**: 613-622.
- Horz, H.-P., Barbrook, A., Field, C. B. et Bohanna, B. J. M., (2004). Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS* **101**(42): 15136-15141.
- Hugenholtz, P., (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* **3**(2): 1-8.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. et Pace, N. R., (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774.
- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. et Bohannon, B. J. M., (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(10): 4399-.
- Huisman, J. et Weissing, F. J., (1999). Biodiversity of plankton by species oscillations and chaos. *Nature* **407-410**: 407-410.
- Huisman, J. et Weissing, F. J., (2001a). Fundamental unpredictability in multispecies competition. *Am. Nat* **157**(5): 488-493.
- Huisman, J. et Weissing, J., (2001b). Biological conditions for oscillations and chaos generated by multispecies competition. *Ecology* **82**(10): 2682-2695.
- Humayoun, S. B., Bano, N. et Hollibaugh, J. T., (2003). Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda Lake in California. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2): 1030-1042.
- Humbert, J.-F. et Le Berre, B., (2001). Genetic diversity in two species of freshwater cyanobacteria, *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* and *P. agardhii*. *Arch. Hydrobiol.* **150**(2): 197-206.
- Hutchinson, G. E., (1961). The paradox of the plankton. *Am. Nat* **XCIV**(882): 137-145.

Iriberry, J., Unanue, M., Barcina, I. et Egea, L., (1987). Seasonal variation in population density and heterotrophic activity of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Appl. Envir. Microbiol.* **53**: 2308-2314.

## J

Jackson, C. R. et Churchill, P. F., (1999). Analysis of microbial communities by denaturing gradient gel electrophoresis: Applications and limitations. *Recent Res. Devel. Microbiology* **3**: 81-91.

Jacquet, S. et Bratbak, G., (2003). Effects of ultraviolet radiation on marine virus-phytoplankton interactions. *FEMS Microb. Ecol.* **44**: 279-289.

Jacquet, S., Briand, J. F., Leboulanger, C., Avois-Jacquet, C., Oberhaus, L., Tassin, B., Vinçon-Leite, B., Paolini, G., Druart, J. C., Anneville, O. et Humbert, J. F., (2005a). 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. et Sime-Ngando, T., (2005b). Estimates of protozoan and virus-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France). *Freshwat. Biol.* **50**: 627-645.

Jacquet, S., Heldal, M., Iglesias-Rodriguez, D., Larsen, A., Wilson, W. et Bratbak, G., (2002). Flow cytometric analysis of an *Emiliana huxleyii* bloom terminated by viral infection. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 111-124.

Jardillier, L. (2004). Etude de différents facteurs de régulation de la structure des communautés procaryotiques en milieu lacustre pélagique. *Ecologie microbienne. Auvergne, Université Blaise Pascal*: 140.

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

Jardillier, L., Bettarel, Y., Richardot, M., Bardot, C., Amblard, C., Sime-Ngando, T. et Debroas, D., (2005a). Effects of viruses and predators on prokaryotic community composition. *Microb. Ecol.*

Jardillier, L., Boucher, D., Personnic, S., Jacquet, S., Thenot, A., Sargos, D., Amblard, C. et Debroas, D., (2005b). Relative importance of nutrients and mortality factors on

- prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status : microcosm experiments. FEMS Microbial Ecology, Sous presse.
- Jaspers, E., Nauhaus, K., Cypionka, H. et Overmann, J., (2001). Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. FEMS Microbiol. Ecol. **36**: 153-164.
- Jensen, E. e. a., (1998). Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Envir. Microbiol. **64**: 575-580.
- Jiang, C.-L. et Xu, L.-H., (1996). Diversity of aquatic *Actinomyces* in lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China. Appl. Environ. Microbiol. **62**(1): 249-253.
- Jiang, S., Steward, G. F., Jellison, R., Chu, W. et Choi, S., (2004). Abundance, distribution, and diversity of viruses in alkaline, hypersaline Mono Lake, California. Microb. Ecol.**47**: 9-17.
- Jiang, S. C. et Paul, J. H., (1998). Gene transfer by transduction in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. **64**(8): 2780-2787.
- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. et Sorensen, J., (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils: a review. Biol. Fertil. Soils **33**: 443-453.
- Jones, G. J., Bourne, D. G., Blakeley, D. G. et Doelle, H., (1994). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. Nat. Toxins **2**: 228-235.
- Jones, J. G., (1977). The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. Freshwater Biology **7**: 67-91.
- Joux, F., Jeffrey, W. H., Lebaron, P. et Mitchell, D. L., (1999). Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. Appl. Environ. Microbiol. **65**(9): 3820-3827.
- Joux, F. et Lebaron, P., (1995). Applications en écologie bactérienne des sondes oligonucléotidiques fluorescentes par les techniques d'hybridation et de cytométrie. OCEANIS **21**(1).
- Jürgens, K. et Güde, H., (1994). The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. Mar. Ecol. Prog. Ser. **112**: 169-188.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. et Amann, R., (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. Appl. Envir. Microbiol. **65**(3): 1241-1250.



**K**

- Kaeberlein, T., Lewis, K. et Epstein, S. S., (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**: 1127-1129.
- Kapuscinski, R. B. et Mitchell, R., (1980). Processes controlling virus inactivation in coastal waters. *Water Res.* **14**: 363-371.
- Karp-Boss, L., Boss, E. et Jumars, J. E., (1996). Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **37**: 71-107.
- Kassen, R., Buckling, A., Bell, G. et Rainey, P., (2000). Diversity peaks at intermediate productivity in a laboratory microcosm. *Nature* **406**: 508-512.
- Kellogg, C. A., Rose, J. B., Jiang, S. C., Thurmond, J. M. et Paul, J. H., (1995). Genetic diversity of related vibriophages isolated from marine environments around Florida and Hawaii, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **120**: 89-98.
- Kirchman, D., (2002a). The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecology* **39**: 91-100.
- Kirchman, D. L., (1994). The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* **28**: 255-271.
- Kirchman, D. L., (2002b). The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecology* **39**: 91-100.
- Kirchman, D. L. et Rich, J. H., (1997). Regulation of bacterial growth rates by dissolved organic carbon and temperature in the equatorial Pacific Ocean. *Microb. Ecol.* **33**: 11-20.
- Kisand, V. et Zingel, P., (2000). Dominance of ciliate grazing on bacteria during spring in a shallow eutrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **22**: 135-142.
- Klein, D., (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* **8**(6): 257-258.
- Knoechel, R. et Holtby, L. B., (1986). Cladoceran filtering rate: body length relationships for bacterial and large algal particles. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 195-200.
- Knoll, S., Zwisler, W. et Simon, M., (2001). Bacterial colonization of early stages of limnetic diatom microaggregates. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**: 141-150.
- Kokjohn, T. A., Sayler, G. S. et Miller, R. V., (1991). Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage under conditions simulating aquatic environments. *J. General Microbiol.* **137**: 661-666.

- Korona, R., Nakatsu, C., Forney, L. et Lensky, R. E., (1994). Evidence for multiple adaptive peaks from populations of bacteria evolving in a structured habitat. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **91**: 9037-9041.
- Kozdroj, J. and van Elsas, J. D., (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol.Methods* **43**: 197-212.
- Kroes, I., Lepp, P. W. et Relman, D. A., (1999). Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *PNAS* **96**(25): 14547-14552.
- Kuske, C. R., Ticknor, L. O., Miller, M. E., Dunbar, J. M., A., D. J., Barns, S. M. et Belnap, J., (2002). Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(4): 1854-1863.

## L

- Labrenz, M., Brettar, I., Christen, R., Flavier, S., Bötel, J. et Höfle, M. G., (2004). Development and Application of a Real-Time PCR Approach for Quantification of Uncultured Bacteria in the Central Baltic Sea. *Appl. Envir. Microbiol.* **70**(8): 4971-4979.
- Lander, E. S., (1999). Array of hope. *Nat. Genet.* **21**: 3-4.
- Langenheder, S. (2005). Links between structure and function of heterotrophic aquatic bacterial communities. Faculty of Science and Technology. Uppsala, Uppsala Universitet: 63.
- Langenheder, S. et Jurgens, K., (2001). Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnol. Oceanogr.* **46**(1): 121-134.
- Lawrence, J. G., Hatfull, G. F. et Hendrix, R. W., (2002). Imbroglios of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.* **184**(17): 4891-4905.
- Leroux, X., Wertz, S., Poly, F., Prosser, J. I., Freitag, T. et Degrange, V. (2005). Role of the diversity of soil microbial communities in their resistance and resilience following disturbances. ESA, Montréal, Canada.
- Lebaron, P., Servais, P., Agogùe, H., Courties, C. et Joux, F., (2001). Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Appl. Envir. Microbiol.* **67**(4): 1775-1782.

- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schäfer, H. et Stackebrandt, E., (1999). Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquat. Microb. Ecol.* **19**: 255-267.
- Leboulanger, C., Dorigo, U., Jacquet, S., Le Berre, B., Paolini, G. et Humbert, J.-F., (2002). Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**: 83-89.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K.-H. et Wagner, M., (1999). Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography- a tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(3): 1289-1297.
- Lee, S. et Fuhrman, J. A., (1991). Spatial and temporal variation of natural bacterioplankton assemblages studied by total genomic DNA cross-hybridization. *Limnol. Oceanogr.* **36**: 1277-1287.
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., Holt, R. D., Shurin, J. B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M. et Gonzales, A., (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecol.Letters* **7**: 601-613.
- Lenski, R. E. et Levin, B. R., (1985). Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *Am. Nat.*: 585-602.
- Lettinga, G., (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van leeuwenhoek* **67**: 3-28.
- Levison, R., Moreland, J. et Nealson, K. H., (1987). Isolation and characterization of a generalized transducing phage for the marine luminous bacterium *Vibrio fischeri* M-J-1. *Gen. Microbiol.* **133**: 1577-1582.
- Levitus, S., Antonov, J. I., Wang, J., Delworth, T. L., Dixon, K. W. et Broccoli, A. J., (2001). Anthropogenic warming of Earth's climate system. *Science* **292**: 267-270.
- Li, W. K. W., (1995). Composition of ultraphytoplankton in the central North-Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **122**: 1-8.
- Lindström, E. S., (1998). Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microb. Ecol.* **27**: 163-174.
- Lindström, E. S., (2000). Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.***40**: 104-113.

- Lindström, E. S. et Bergström, A.-K., (2004). Influence of inlet bacteria on bacterioplankton assemblage composition in lakes of different hydraulic retention time. *Limnol. Oceanogr.* **49**(1): 125-136.
- Lindström, E. S. et Leskinen, E., (2002). Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecol.* **44**: 1-9.
- Liu, H., Nolla, H. A. et Campbell, L., (1997a). Prochlorococcus growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **12**: 39-47.
- Liu, W.-T., Marsh, T. L., Cheng, H. et Forney, L., (1997b). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(11): 4516-4522.
- Long, R. A. et Azam, F., (1996). Abundant protein-containing particles in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* **10**: 213-221.
- Loreau, M., Naeem, S. et Inchausti, P. (2002). Biodiversity and ecosystem functioning. New York, NY, Oxford University Press.
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. et Eck, J., (2002). Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 572-577.
- Lovejoy, C., Bowman, J. P. et Hallegraeff, G. M., (1998). Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(8): 2806-2813.
- Lu, J., Chen, F. et Hodson, E. R., (2001). Distribution, isolation, host specificity, and diversity of cyanophages infecting marine *Synechococcus* spp. in River Estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 3285-3290.
- Ludwig, W. et Schleifer, K.-H., (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 155-173.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neimaier, J., Bachleitner, M. et Schleifer, K.-H., (1998). Bacterial phylogeny basend on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- Luna, G. M., Manini, E. et Danovaro, R., (2002). Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(7): 3509-3513.

**M**

- Maar, M., Arin, L., Simo, R., Sala, M. M., Peters, F. et Marassé, C., (2002). Combined effects of nutrients and small-scale turbulence in a microcosm experiment. II. Dynamics of organic matter and phosphorus. *Aquat. Microb. Ecol.* **29**: 63-72.
- Madigan, M. T., Martinlo, M. T. et Parker, J., (2000). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, N.Y.: Prentice-Hall.
- Malits, A. et Weinbauer, M. G. (2005). Effect of turbulence on viral control of prokaryotic biomass, production and diversity. ASLO Summer meeting, Santiago de Compostela.
- Manage, P., Kawabata, Z. et Nakano, S., (2000). Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. *Aquat. Microb. Ecol.* **22**(2): 111-117.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, B. S. et Bailey, M. J., (2002). RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11): 5367-5373.
- Maranger, R. et Bird, D. F., (1995). Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **121**: 217-226.
- Marie, D., Brussard, C. P. D., Thyraug, R., Bratbak, G. et Vaultot, D., (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1): 45-52.
- Marsh, T. L., (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) : an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microb.* **2**: 323-327.
- Marston, M. F. et Sallee, J. L., (2003). Genetic diversity and temporal variation in the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* species in Rhode Island's coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(8): 4639-4647.
- Martin, A. P., (2002). Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(8): 3673-3682.
- Martinez, N. D. (1996). Defining and measuring functional aspects of biodiversity. *Biodiversity- A biology of numbers and differences*. K. H. Gaston. Oxford, Blackwell Science: 114-118.
- Marvalin, O., (1987). Successions et stratégies de développement au sein des communautés bactériennes. *Naturaliste Can.* **114**: 413-420.

- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. et DeLong, E. F., (1997). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(1): 50-56.
- Mayr, E., (1982). Biologie is not postage stamp collecting. *Science* **216**: 718-720.
- McCaig, A. E., Glover, A. L. et Prosser, J. I., (1999). Molecular Analysis of bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Grass Pastures. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(4): 1721-1730.
- McDaniel, L. et Paul, J. H., (2005). Effect of nutrient addition and environmental factors on prophage induction in natural populations of marine *Synechococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(2): 842-850.
- McDonald, I., Radajewski, S. et Murrell, C. J., (2005). Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. *Organic Geochemistry* **36**: 779-787.
- Mendzhul, M. I., Lysenko, T. G., Busakhina, I. V. et Shainskaia, O. A., (2004). Phagoresistance of filamentous cyanobacterial clones. *Microbiol. Z.* **66**(1): 48-56.
- Mercer, D., Iqbal, M., Miller, P. et McCarthy, A., (1996). Screening *actinomycetes* for extracellular peroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2186-2190.
- Méthé, B. A., Hiorns, W. D. et Zehr, J. P., (1998). Contrast between marine and freshwater bacterial community composition: analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 368-374.
- Méthé, B. A. et Zehr, J. P., (1999). Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect water chemistry? *Hydrobiol.* **401**: 77-96.
- Meybeck, M., (2004). The global change of continental aquatic systems: dominant impacts of human activities. *Water Sci. Technol.* **49**(7): 73-83.
- Middelboe, M., (2000). Bacterial growth rate and marine virus-host dynamics. *Microb. Ecol.* **40**: 114-124.
- Middelboe, M. (2005). Virus dynamics in marine sediments: implications for benthic carbon cycling. EWAPE1, Thonon les Bains.
- Middelboe, M., Hagström, Å., Blackburn, N., Sinn, B., Fischer, U. R., Borch, N. H., Pinhassi, J., Simu, K. et Lorenz, M. G., (2001). Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microbial Ecol.* **42**: 395-406.
- Middelboe, M., Jorgensen, N. O. G. et Kroer, N., (1996). Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1991-1997.

- Miller, R. V., (1988). Potential for transfer and establishment of engineered genetic sequences. *Trends Biotechnol.* **6**: S23-S27.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T. et Naganuma, T., (2005). Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(2): 1084-1088.
- Mohn, W. W., (1995). Bacteria obtained from a sequencing batch reactor that are capable of growth on dehydroabietic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(6): 2145-2150.
- Morris, C. E., Bardin, M., Berge, O., Frey-Klett, P., Fromin, N., Girardin, H., Guinebretière, M.-H., Lebaron, P., Thiéry, J. M. et Troussellier, M., (2002a). Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(4): 592-616.
- Morris, D. P. et Lewis, W. R., (1992). Nutrient limitation of bacterioplankton growth in Lake Dillon, Colorado. *Limnol. Oceanogr.* **37**(6): 1179-1192.
- Morris, S. A., Radajewski, S., Willison, T. W. et Murrell, J. C., (2002b). Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(3): 1446-1453.
- Mueller, A. K., Westergaad, K., Christensen, S. et Sorensen, S. J., (2001). The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microb. Ecol.* **36**: 11-19.
- Murray, A. E., Hollibraugh, J. T. et Orrego, C., (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7): 2676-2680.
- Murray, A. E., Preston, C. M., Massana, R., Blakis, A., Wu, K. et DeLong, E. F., (1998). Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(7): 2585-2595.
- Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M. et Vyverman, W., (2002). Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(10): 4740-4750.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. et Uitterlinden, A. G., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3): 695.

**N**

- Naeem, S., (2002). Disentangling the impacts of diversity on ecosystem functioning in combinatorial experiments. *Ecology* **83**(10): 2925-2935.
- Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka, N., Shirai, Y., Nishida, K., Itakura, S. et Yamagushi, M., (2004). Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(2).
- Noble, R. T. et Fuhrman, J. A., (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb.Ecol.* **14**: 113-118.
- Nold, S. C. et Zwart, G., (1998). Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. *Aquat. Ecol.* **32**: 17-35.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. et Muyzer, G., (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.***2**(2): 217-226.
- Nunan, N., Wu, K., Young, I. M. et Ritz, K., (2002). *In situ* spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. *Microb. Ecol.***44**(4): 296-305.

**O**

- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L. et Schleper, C., (2003). Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ. Microbiol.***5**(9): 787-797.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J. et Pace, N. R., (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**: 337-365.
- Olson, B. H., (1991). Tracking and using genes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 604-611.
- Olson, B. H. et Tsai, Y. L., (1992). Molecular approaches to environmental management. *Environ. Microbiol.*, Wiley-Liss, Inc. p 239-263.
- Ortmann, A. C., Lawrence, J. E. et Suttle, C. A., (2002). Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the cyanobacterium *Synechococcus* spp. *Microb. Ecol.***43**: 225-231.
- Østensvik, Ø., Skulberg, O. M., Underdal, B. et Hormazabal, V., (1998). Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria - a comparative study of bacterial bioassays. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 117-1124.



- Øvreås, L., Bourne, D. G., Sandaa, R. A., Casamayor, E. O., Benlloch, S., Goddard, V. J., Smerdon, G., Heldal, M. et Thingstad, T. F., (2003). Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**: 109-121.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L. et Torsvik, V., (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(9): 3367-3373.
- Øvreås, L., Jensen, S., Daae, F. L. et Torsvik, V., (1998). Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(7): 2739-2742.

## P

- Pace, M. L. et Cole, J. J., (1994). Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microb. Ecol.* **28**: 181-193.
- Pace, M. L., Lane, D. J., Olsen, G. J. et Stahl, D. A., (1986a). Phylogenetic analysis of organisms and populations using ribosomal RNA sequences. *Proc. Fourth Interatl. Symp. on Microbial Ecology*: 117-122.
- Pace, M. L., Stahl, D. A., Lane, D. J. et Olsen, G. J., (1985). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Am. Soc. Microbiol. News* **51**: 4-12.
- Pace, N., (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734-740.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. et Olsen, G. J., (1986b). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol* **9**: 1-55.
- Padan, E. et Shilo, M., (1973). Cyanophages-viruses attacking blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* **37**(3): 343-370.
- Pakulski, J. D., Coffin, R. B., Kelley, C. A., Holder, S. L., Downer, R., Aas, P., Lyons, M. M. et Jeffrey, W. H., (1996). Iron stimulation of Antarctic bacteria. *Nature* **383**: 133-134.
- Palumbo, A. V., Ferguson, R. L. et Rublee, P. A., (1984). Size of suspended bacterial cells and association of heterotrophic activity with size fractions of particles in estuarine and coastal waters. *Appl. Envir. Microbiol.* **48**: 157-164.

- Palys, T., Nakamura, L. K. et Cohan, F. M., (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Intern.J. System. Bacteriol.* **47**(4): 1145-1156.
- Papke, T. R., Ramsing, N. B., Bateson, M. M. et Ward, D. M., (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* **5**(8): 650-659.
- Park, H.-D., Sasaki, Y., Maruyama, T., Yanagisawa, E., Hiraishi, A. et Kato, K., (2001). Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environ. Toxicol.* **16**(4): 337-343.
- Partensky, F., Blanchot, J. et Vaultot, D., (1999). Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bull. Inst. Oceanogr. Monaco Numero Spec.* **19**: 431-449.
- Paul, J. H., (1999). Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 45-50.
- Paul, J. H., Rose, J. B., Jiang, S. C., Kellogg, C. A. et Dickson, L., (1993). Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 718-724.
- Paul, J. H., Sullivan, M. B., Segall, A. M. et Rohwer, F., (2002). Marine phage genomics. *Comparative Biochemistry and Physiology I art* **133**: 463-476.
- Pedros-Alio, C. et Brock, T. D., (1983). The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Arch. Hybrobiol.*(98).
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, I. J., MacLean, M. H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J. M. et Guixa-Boixereu, N., (2000). The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol.Ecol.* **32**: 143-155.
- Pender, S., Toomey, M., Carton, M., Eardly, D., Patching, J. W., Colleran, E. et O'Flaherty, V., (2004). Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Res.* **38**: 619-630.
- Perga, M. (2004). Origines et flux de carbone dans les reseaux trophiques lacustres : Etude par analyse de la composition en isotopes stables du carbone et de l'azote du zooplancton et des poissons. Savoie. Chambery, Haute Savoie: 198.
- Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R. et Amann, R. I., (1998). Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11): 4299-4306.

- Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, A., Glöckner, F. O., Nübel, U., Psenner, R. et Amann, R., (2001). Predator-specific enrichment of *Actinobacteria* from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(5): 2145-2155.
- Petchey, O. L., (2000). Species diversity, species extinction, and ecosystem function. *The Am. Nat.* **155**(5): 696-702.
- Petchey, O. L., Hector, A. et Gaston, K. J., (2004). How do different measures of functional diversity perform? *Ecology* **85**(3): 847-857.
- Peters, F., Marrasé, C., Havskum, H., Rassoulzadegan, F., Dolan, J., Alcaraz, M. et Gasol, J. M., (2002). Turbulence and the microbial food web: effects on bacterial losses to predation and on community structure. *J. Plankt.Res.* **24**(4): 321-331.
- Pickett, S. T. A. et White, P. S., (1985). *The ecology of natural disturbance and patch dynamics*. Orlando, FL: Academic.
- Pickup, R. W., (1991). Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1009-1019.
- Pinhassi, J., Asam, F., Hemphälä, j., Long, R. A., Martinez, J., Zweifel, U. L. et Hagström, Å. (1999). Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquat. Microb.Ecol.* **17**: 13-26.
- Pinhassi, J. et Berman, T., (2003). Differential growth response of colony-forming alpha - and gamma-Proteobacteria n dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(1): 199-211.
- Pinhassi, J. et Hagström, Å. (2000). Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb.Ecol.* **21**: 245-256.
- Pinhassi, J., Montserrat Sala, M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, O., Malits, A. et Marrasé, C., (2004). Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(11): 6753-6766.
- Pinhassi, J., Winding, A., Binnerup, S. J., Zweifel, U. L., Riemann, B. et Hagström, Å. (2003). Spatial variability in bacterioplankton community composition at the Skagerrak-Kattegat Front. *Mar. Ecol.Progr.Ser.* **255**: 1-13.
- Pomeroy, L. R., (1974). The oceans food web, a changing paradigm. *BioScience* **24**: 499-504.
- Pourriot, R. et Meybeck, M. (1995). *Limnologie générale*. Paris, Masson.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (1996). *Microbiology*, Wm. C. Brown Publishers.

- Price, P. B., (2000). A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *PNAS* **97**(3): 1247-1251.
- Proctor, L. M. et Fuhrman, (1990). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* **343**: 60-62.

## R

- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. et Murrell, C. J., (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**: 646-649.
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D. S., Morris, S. A., Ineson, P., Nedwell, D. B., Prosser, J. I. et Murrell, C. J., (2002). Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiol.***148**: 2331-2342.
- Ramachandra, M., Crawford, D. et Hertel, G., (1988). Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3057-3063.
- Ranjard, L., F., P., Lata, J.-C., Muogel, C., Thioulouse, J. et Nazaret, S., (2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(10): 4479-4487.
- Ranjard, L., Lejon, D. P. H., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. et Chaussod, R., (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **5**(11): 1111-1120.
- Ranjard, L., Poly, F. et Nazaret, S., (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* **151**: 167-177.
- Ranjard, L. et Richaume, A., (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* **152**: 707-716.
- Rappé, M. S. et Giovannoni, S. J., (2003). The uncultured microbial majority. *Ann. Rev. Microbiol.* **57**: 369-394.
- Rappé, M. S., Kemp, P. F. et Giovannoni, S. J., (1997). Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 811-826.

- Rashidan, K. K. et Bird, D. F., (2000). Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microb. Ecol.*
- Reysenbach, A.-L., Giver, L. J., Wickham, G. S. et Pace, N. R., (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(10): 3417-3418.
- Rheims, H., Felske, A., Seufert, S. et Stackebrandt, E., (1999). Molecular monitoring of an uncultured group of the class Actinobacteria in two terrestrial environments. *J. Microbiol. Methods* **36**: 65-75.
- Riemann, B., (1978). Differentiation between heterotrophic and photosynthetic plankton by size fractioning, glucose uptake, ATP, and chlorophyll content. *Oikos* **31**: 358-367.
- Riemann, L. et Middelboe, M., (2002). Stability of bacterial and viral community composition in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 219-232.
- Riemann, L., Steward, G. F. et Azam, F., (2000). Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Applied and Environ.l Microbiol.* **66**(2): 578-587.
- Riemann, L., Steward, G. F., Fandino, L. B., Campbell, L., Landry, M. R. et Azam, F., (1999). Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or rRNA genes. *Deep Sea Res.II* **46**: 1791-1811.
- Riemann, L. et Winding, A., (2001). Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microb. Ecol.***42**: 274-285.
- Ritz, K., Griffiths, B. S., Torsvik, V. et Hendriksen, N. B., (1997). Analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**: 151-156.
- Rohwer, F., (2003). Global phage diversity. *Cell* **113**: 141.
- Rohwer, F. et Edwards, R., (2002). The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* **184**(16): 4529-4535.
- Rohwer, F., Seguritan, V., Choi, D. H. et Azam, F., (2001). Production of shotgun libraries using random amplification. *Biotechniques* **31**: 108-118.
- Röling, W. F. M., Van Breukelen, B. M., Braster, M., Lin, B. et Van Versevel, H. W., (2001). Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(10): 4619-4629.

Rosello-Mora, R. et Amann, R. I., (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 39-67.

## S

Salmaso, N., (2000). Factors affecting the seasonality and distribution of cyanobacteria and chlorophytes: a case study from the large south of the Alps, with special refernce to lake Garda. *Hydrobiol.***438**: 43-63.

Salomon, P. S., Janson, S. et Granéli, E., (2003). Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae* 2: 261-272.

Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, O., Daae, L. F., Castberg, T. et Hahn, D., (1999). Analysis of bacterial communties in heavy metal-contaminated soils at differnet levels of resolution. *FEMS Microb. Ecol.* **30**: 237-351.

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

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. et Smith, M., (1977). Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**(5596): 687-695.

Sano, E., Carlson, S., Wegley, L. et Rohwer, F., (2004). Movement of viruses between biomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(10): 5842-5846.

Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R., Stackebrandt, E., Troussellier, M., Guindulain, T., Vives-Rego, J. et 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., Balagué, V., Pedros-Alio, C. et Massana, R., (2003). Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**: 163-174.

Schauer, M., Massana, R. et Pedrós-Alió, C., (2000). Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalon coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol.Ecol.* **33**: 51-59.

- Scheffer, M., Rinaldi, S., Huisman, J. et Weissing, F. J., (2003). Why plankton communities have no equilibrium: solutions to the paradox. *Hydrobiol.* **491**: 9-18.
- Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E. et Davis, R. W., (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotech.* **16**: 301-306.
- Schröder, D. C., Oke, J., Hall, M., Malin, G. et Wilson, W. H., (2003). Virus succession observed during an *Emiliana huxleyi* bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(5): 2484-2490.
- Schroeder, D. C., Oke, J., Malin, G. et Wilson, W. H., (2002). Coccolithovirus (*Phycodnaviridae*): Characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliana huxleyi*. *Arch. Virol.* **147**(9): 1685-1698.
- Schwalbach, M., Hewson, I. et Furrman, J. A., (2004). Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms. *Aquat. Microb. Ecol.* **34**: 117-127.
- Schwalbach, M. S., Brown, M. V. et Furrman, J. A., (2005). Impact of light on marine bacterioplankton community structure. *Aquat. Microb. Ecol.* **39**(3): 235-245.
- Schweitzer, B., Huber, I., Amann, R., Ludwig, W. et Simon, M., (2001). Alpha and beta proteobacteria control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(3): 632-645.
- Sebat, J. L., Colwell, F. S. et Crawford, R. L., (2003). Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(8): 4927-4934.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T. et Amann, R. I., (2003). An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(5): 2928-2935.
- Selje, N. et Simon, M., (2003). Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquat. Microb. Ecol.* **30**: 221-237.
- Sherr, E. B. et Sherr, B. F., (1987). High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. *Nature* **325**: 710-711.
- Short, C. M. et Suttle, C. A., (2005). Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1): 480-486.

- Short, S. M. et Suttle, C. A., (2002). Sequence analysis of marine virus communities reveals that groups of related algal viruses are widely distributed in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(3): 1290-1296.
- Sieburth, J. M., (1967). Seasonal selection of estuarine bacteria by water temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1**: 98-121.
- Sieburth, J. M., Johnson, P. W. et Hargraves, P. E., (1988). Ultrastructure and ecology of *Aureococcus anophagefferens* gen. et sp. nov. (*Chrysophyceae*): the dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, summer 1985. *J. Phycol.* **24**: 416-425.
- Simek, K., Kojacka, P., Nedoma, J., Hartman, P., Vrba, J. et Dolan, D. R., (1999). Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* **20**: 1634-1644.
- Simek, K., Macek, K. et Vyhnalek, V., (1990). Uptake of bacteria-sized fluorescent particles by natural protozoan assemblage in a reservoir. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **34**: 275-281.
- Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M. G., Hornak, K., Dolan, J. R., Nedoma, J., Mašín, M. et Amann, R. I., (2001). Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellated grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(6): 2723-2733.
- Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J. et Psenner, R., (1997). Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(2): 578-595.
- Sime-Ngando, T., (1997). Importance des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques microbiens aquatiques. *Année Biologique* **36**: 181-210.
- Simon, M., (1985). Specific uptake rates of amino acids by attached and free-living bacteria in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1254-1259.
- Simon, M., Cho, B. C. et Azam, F., (1992). Significance of bacterial biomass in lakes and in ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **86**: 103-110.
- Simon, M., Glöckner, F. O. et Amann, R., (1999). Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **18**: 275-284.



- Smith, D. C., Simon, A. L., Alldredge, A. L. et Azam, F., (1992). Intensive hydrolytic activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* **359**: 139-141.
- Smith, E. M. et Del Giorgio, P. A., (2003). Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? *Aquat. Microb. Ecol.* **31**: 203-208.
- Smith, E. M. et Prairie, Y. T., (2004). Bacterial metabolism and growth efficiency in lakes: the importance of phosphorus availability. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 137-147.
- Smith, R. J., Muir, R. D. J., Walpole, M. J., Balmford, A. et Leader-Williams, N., (2003). Governance and the loss of biodiversity. *Nature* **426**(67-70).
- Sommaruga, R., (2001). The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *J. Photochem. Photobiol.* **62**: 35-42.
- Sommer, U., (1985). Comparison between steady state and non-steady state competition: Experiments with natural phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **30**: 335-436.
- Søndergaard, M., Borch, N. H. et Riemann, B., (2000). Dynamics of biodegradable DOC produced by freshwater plankton communities. *Aquat Microb Ecol* **23**: 73-83.
- Stackebrandt, E. et Goebel, B. M., (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Staley, J. T. et Konopka, A., (1985). Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 321-346.
- Stein, J. L., Marsh, T. L., Wu, K. Y., Shizuya, H. et DeLong, E. F., (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planctonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* **178**(3): 591-599.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. et Breznak, J. A., (2004). New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8): 4748-4755.
- Stroffek, S. (1990). Les transferts verticaux de matière et leur modification par les bactéries hétérotrophes fixées sur particules en sédimentation dans les eaux de surface de deux grands lacs alpins (lac Léman, lac du Bourget, France). Thonon-les-Bains : INRA, 235 p. Thèse doct. : Analyse et modélisation des systèmes biologiques : Université C. Bernard ; Lyon I.
- Suikkanen, S., Fistarol, G. O. et Grenéli, E., (2004). Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *J. Exp.Mar.Biol. Ecol.* **308**: 85-101.

- Sullivan, M. B., Coleman, M. L., Weigele, P., Rohwer, F. et Chisholm, S. W., (2005). Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *Plos Biology* **3**(5): e144.
- Sullivan, M. B., Waterbury, J. B. et Chisholm, S. W., (2003). Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature* **424**: 1047-1051.
- Suttle, C. A. (2000a). Cyanophages and their control in the ecology of cyanobacteria. *The Ecology of Cyanobacteria*. B. A. Whitton et M. Potts. Netherlands, Kluwer Academic Publisher.
- Suttle, C. A. (2000b). Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. *Viral ecology*. C. J. Hurst, Academic Press: 247-296.
- Suttle, C. A., (2000c). Ecological, evolutionary, and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. 247-296.
- Suttle, C. A. (2000d). *The ecology of Cyanobacteria-their diversity in time and space*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Suttle, C. A. et Chan, A. M., (1993). Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Mari. Ecol. Prog. Ser.* **92**: 99-109.
- Suttle, C. A. et Chen, F., (1992). Mechanisms and Rates of Decay of Marine Viruses in Seawater. *Appl. Envir. Microbiol.* **58**: 3721-3729.
- Suzuki, M. T., (1999). Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquat. Microb. Ecol.* **20**(261-272).
- Suzuki, M. T. et Giovannoni, S. J., (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625-630.

## T

- Taddei, F., Matic, I. et Radman, M., (1996). Du nouveau sur l'origine des espèces. *La Recherche* **291**: 52-59.
- Tadonléléké, R. et Sime-Ngando, T., (2000). Rates of growth and microbial grazing mortality of phytoplankton in a recent artificial lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **22**: 301-313.

- Tarutani, K., Nagasaki, K. et Yamaguchi, M., (2000). Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashiwo*. *Appl. Envir. Microbiol.* **66**(11): 4916-4920.
- Taylor, J. W., Schupp, P. J., de Nys, R., Kjelleberg, S. et Steinberg, P. D., (2005). Biogeography of bacteria associated with the marine sponge.
- Thingstad, F. et Rassoulzadegan, F., (1999). Conceptual models for the biogeochemical role of the photic zone microbial food web, with particular reference to the Mediterranean Sea. *Prog. Oceanogr.* **44**: 271-286.
- Thingstad, T. F. et Lignell, R., (1997). Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat. Microb. Ecol.* **13**: 19-27.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., Ferreira de Siqueira, M., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Peterson, T. A., Philips, O. L. et Williams, S. E., (2004). Extinction risk from climate change. *Nature* **427**: 145-148.
- Thouvenot, A., Richardot, M., Debroas, D. et Devaux, J., (1999). Bacterivory of metazooplankton, ciliates and flagellates in a newly flooded reservoir. *J. Plankt. Res.* **21**(9): 1659-1679.
- Tilman, D., (2000). Causes, consequences and ethics of biodiversity. *Nature* **405**: 208-211.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W. H., Simberloff, D. et Swackhamer, D., (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* **292**: 281-284.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M. et Siemann, E., (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* **277**: 1300-1302.
- Tonolla, M., Peduzzi, P., Hahn, D. et Peduzzi, P., (2003). Spatio-temporal distribution of phototrophic sulfur bacteria in the chemocline of meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *FEMS Microb. Ecol.* **43**: 89-98.
- Torrella, F. et Morita, R. Y., (1979). Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**(4): 774-778.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A. et Øvreås, L., (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**: 53-62.

- Torsvik, V., Goksøyr, J. et Daae, F. L., (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(3): 782-787.
- Torsvik, V. et Ovreas, L., (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr.Op. Microbiol.* **5**: 240-245.
- Torsvik, V., Øvreås, L. et Thingstad, T. F., (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science Environ. Microbiol.* **296**: 1064-1066.
- Turner, S., DeLong, E. F., Giovannoni, S. J., Olsen, G. J. et Pace, N. R., (1989). Phylogenetic analysis of microorganisms and natural populations using ribosomal RNA sequences. In, "Microbial Mats: Ecological physiology and benthic microbial communities," Y. Cohen and E. Rosenberg (eds.). *Am. Soc. Microbiol.*: 390-401.
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardot, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S. et Banfield, J. F., (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**: 37-43.

## U

- Unanue, M., Ayo, B., Azua, I., Barcina, I. et Iriberry, J., (1992). Temporal variability of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Microb. Ecol.* **23**: 27-39.
- Urbach, E., Vergin, K. L., Young, L., Morse, A., Larson, G. L. et Giovannoni, S. J., (2001). Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic crater lake. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 557-572.

## V

- Van der Gucht, K., Sabbe, K., De Meester, L., Vloemans, N., Zwart, G., Gillis, M. et Vyverman, W., (2001). Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environ.Microbiol.***3**(11): 680-690.
- van Hannen, E., Zwart, G., van Agterveld, M. P., Gons, H. J., Ebert, J. et Laanbroek, H. J., (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(2): 795.
- van Regenmortel, M. H. V., (1990). Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Interviol.* **31**: 241-254.

- van Regenmortel, M. H. V. (2000). Introduction to the species concept in virus taxonomy. *Virus Taxonomy, Classification et Nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses.* M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop et al. San Diego (California), Academic Press, Inc.: 3-16.
- Van Wambeke, F., Christaki, U., Giannakourou, A., Moutin, T. et Souvemerzoglou, K., (2002). Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the mediterranean sea. *Microb. Ecol.***43**: 119-133.
- van Wintzingerode, F., Göbel, U. B. et Stackebrandt, E., (1997). Determination of diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Kerksters, K. et Swings, J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**(2): 407-438.
- Vaqué, D., Guixa-Boixereu, N., Gasol, J. M. et Pedrós-Alió, C., (2002). Distribution of microbial biomass and importance of protists in regulating prokaryotic assemblages in three areas close to the Antarctic Peninsula in spring and summer 1995/96. *Deep-Sea Res. II* **49**: 847-867.
- Veldhuis, M. J. W., Kraay, G. W., Van Bleijswijk, J. D. L. et Baars, M. A., (1997). Seasonal and spatial variability in phytoplankton biomass, productivity and growth in the northwestern Indian Ocean: the southwest and northeast monsoon 1992-1993. *Deep Sea Res.***44**: 425-449.
- 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., Neelson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parson, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H. et Smith, H. O., (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- Vetriani, C., Tran, H. V. et Kerkhof, L. J., (2003). Fingerprinting microbial assemblages from the oxic-anoxic chemocline of the black sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(11): 6481-6488.
- Vezi, a., Campanaro, S., D'Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F. M., Cestaro, A., Malacrida, G., Simionati, B., Cannata, N., Romualdi, C., Bartlett, D. H. et Valle, G., (2005). Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* **307**: 1459-1461.

- Vila, X., Abella, C. A., Figueras, J. B. et Hurley, J. P., (1998). Vertical models of phototrophic bacterial distribution in the metalimnetic microbial communities of several freshwater North-American kettle lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 287-299.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenko, J. et al., e., (1997). Humain domination of Earth's ecosystems. *Science* **277**: 494-499.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P. et Neve-von Caron, G., (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol.Ecol.* **24**: 429-448.

## W

- Wang, G. C.-Y. et Wang, Y., (1997). Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Envir. Microbiol.* **63**(12): 4645-4650.
- Wang, I.-N., Smith, D. L. et Young, R., (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Ann. Rev. Microbiol.* **54**: 799-825.
- Wang, K. et Chen, F., (2004). Genetic diversity and population dynamics of cyanophage communities in the Chesapeake Bay. *Aquat. Microb. Ecol.* **34**: 105-116.
- Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R. et Ruff-Robers, A. L., (1992). Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *Ads. Microb. Ecol.* **12**: 219-286.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C. et Bateson, M. M., (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1353-1370.
- Ward, D. M., Santegoeds, C. M., Nold, S. C., Ramsing, N. B., Ferris, M. J. et Bateson, M. M., (1999). Biodiversity within hot spring microbial mat communities: molecular monitoring of enrichment cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 143-150.
- Ward, D. M., Weller, R. et Bateson, M. M., (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**(63-65).
- Wardle, D. A., Bonner, K. I. et Barker, G. M., (2000). Stability of ecosystem properties in response to above-ground functional group richness and composition. *Oikos* **89**: 11-23.
- Warren, R. A. J., (1980). Modified Bases in Bacteriophage DNAs. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**: 137-158.
- Watanabe, K. et Baker, P. W., (2000). Environmentally relevant microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**(1): 1-11.

- Wawrik, B., Paul, J. H. et Tabita, F. R., (2002). Real-time PCR quantification of *rbcl* (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) mRNA in diatoms and pelagophytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(8): 3771-3779.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. et Truper, H. G., (1987). Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.
- Weinbauer, M. G., (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microb. Rev.* **27**: 127-181.
- Weinbauer, M. G. et Höfle, M. G., (1998). Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(10): 3776-3783.
- Weinbauer, M. G. et Rassoulzadegan, F., (2004). Minireview: Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.* **6**(1): 1-11.
- Weinbauer, M. G. et Suttle, C. A., (1996). Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(12): 4374-4380.
- Weiss, P., Schweitzer, B., Amann, R. I. et Simon, M., (1996). Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(6): 1998-2005.
- Wenderoth, D. et Reber, H., (1999). Development and comparison of methods to estimate the catabolic versatility of metal-affected soil microbial communities. *Soil Biology and Biochem.* **31**: 1793-1802.
- Wertz, S., Dégrange, V., Poly, F., Prosser, J. I., Freitag, T. et Le Roux, X. (2005). Impact of decreasing the diversity of soil microbial heterotrophic, denitrifying and ammonia-oxidizing communities on their functioning. ESA, Montréal, Canada.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology, lake and river ecosystem*. San Diego, California, Academic Press.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. et Taylor, J. W., (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* **301**: 976-978.
- Whitby, C., Bailey, M. J., Whiteley, A. S., Murrell, C. J., Kilham, K., Prosser, J. I. and Lappin-Scott, H., (2005). Stable isotope probing links taxonomy with function in microbial communities. *ASM News* **71**(4): 169-173.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. et Wiebe, W. J., (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6578-6583.

- Wichels, A., Biel, S. S., Gelderblom, H. R., Brinkhoff, T., Muyzer, G. et Schütt, C., (1998). Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11): 4128-4133.
- Wilcox, R. M. et Fuhrmann, J. A., (1994). Bacterial viruses in coastal sea water: lytic rather than lysogenic production. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **114**: 35-45.
- Wilhelm, S. W. et Suttle, C. A., (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea. *BioScience* **49**(10): 781-787.
- Williamson, K. E., Radosevich, M. et Wommack, E. K., (2005). Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. *Appl. Envir. Microbiol.* **71**(6): 3119-3125.
- Wilson, W. H., Fuller, N. J., Joint, I. et Mann, N. H., (1999). Analysis of cyanophage diversity and population structure in a south-north transect of the Atlantic ocean. *Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco n°special* **19**: 209-216.
- Wilson, W. H., Fuller, N. J., Joint, I. R. et Mann, N. H. (2000). Analysis of cyanophage diversity in the marine environment using denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbial Biosystems: New Frontiers*, Halifax, Canada.
- Wilson, W. H., Joint, I., Carr, N. G. et Mann, N. H., (1993). Isolation and molecular characterization of five marine cyanophages propagated on *Synechococcus* sp. strain WH7803. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(11): 3736-3743.
- Wilson, W. H. et Mann, N. H., (1997). Lysogenic and lytic viral production in marine microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* **13**: 95-100.
- Winter, C., Moeseneder, M. M. et Herndl, G. J., (2001). Impact of UV radiation on bacterioplankton community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(2): 665-672.
- Wintzingerode, F. V., Goebel, U. B. et Stackebrandt, E., (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microb. Rev.* **21**: 213-229.
- Woese, C. R., (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev* **51**: 221-271.
- Woese, C. R. and Fox, G. E., (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **74**: 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L., (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domain Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **87**: 4576-4579.
- Wommack, K. E. and Colwell, R. R., (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(1): 69-114.



- Wommack, K. E., Ravel, J., Hill, R. T., Chun, J. and Colwell, R. R., (1999). Population dynamics of Chesapeake Bay Virioplankton: total-community analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1): 231-240.
- Worm, J., Gustavson, K., Garde, K., Borch, N. H. and Søndergaard, M., (2001). Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms. *Aquat. Microb.Ecol.* **25**: 103-111.
- Wright, R. T. and Coffin, R. B., (1983). Planctonic bacteria in estuarine and coastal waters of northern Massachusetts: spatial and temporal distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**: 205-216.
- Wu, L., Thompson, D. K., Li, G., Li, Hurt, R. A., Tiedje, J. M. and Zhou, J., (2001). Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(12): 5780-5790.

## Y

- Yannarell, A. C., Kent, A. D., Lauster, G. L., Kratz, T. K. and Triplett, E. W., (2003). Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microb.Ecol.*
- Yannarell, A. C. and Triplett, E. W., (2004). Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(1): 214-223.
- Yannarell, A. C. and Triplett, E. W., (2005). Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1): 227-239.

## Z

- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. and Keller, M., (2002). Cultivating the uncultured. *PNAS* **99**(24): 15681-15686.
- Zhong, Y., Chen, F., Wilhelm, S. W., Poorvin, L. and Hodson, R. E., (2002). Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein Gene g20. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(4): 1576-1584.

- 
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D. S., Wu, L.-J., Marsh, T. L., O'Neill, R. V., Palumbo, A. V. and Tiedje, J. M., (2002). Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(1): 326-334.
- Zuckerland, E. and Pauling, L., (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins, In *Evolving genes and proteins*, V. Bryson and H.J. Vogel (éd), academic Press, New York, pp.97-166.
- Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Ferry, H. and Suk-Kyun, H., (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 141-155.
- Zweifel, U. L. and Hagström, Å. (1995). Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid containing "ghosts". *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2180-2185.
- Zwisler, W., Selje, N. and Simon, M., (2003). Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**: 211-225.



# ANNEXES



-ANNEXE I –

**ECHANTILLONNAGE ET TRAITEMENT DE L'EAU RECOLTEE**

**I. 1. Echantillonnage et traitement de l'eau pour analyse de la diversité eubactérienne**

- 1) 500mL d'eau sont récoltés à diverses profondeurs (ex. : 2, 15, 30 ou 50 m) du lac et placé dans une bouteille en plastique, pré-rincée avec de l'eau du lac provenant de la même profondeur.
- 2) Les bouteilles sont placées à l'intérieur d'une glacière et transportées au laboratoire, où les échantillons sont conservés dans le réfrigérateur à l'obscurité
- 3) L'eau brute est pré-filtrée sur un filtre en polycarbonate de 47 mm de diamètre et de 2 µm de porosité (ex. Nucléopore ou Whatman). Cette étape permet la récolte les cellules les plus grosses (phytoplancton et zooplancton). Le filtre est placé au sein d'un Eppendorf stérile de 2 mL et au congélateur.
- 4) 250 mL de la fraction d'eau < 2 µm sont filtrés sur un filtre en polycarbonate de 47 mm de diamètre et de 0,2 µm de porosité (ex. Nucléopore ou Whatman). Ce filtre est conservé au sein d'un Eppendorf stérile de 2 mL et placé au congélateur.

**I. 2. Echantillonnage et traitement de l'eau pour analyse de la diversité des cyanophages**

- 1) 20 L d'eau sont prélevés à une profondeur déterminée
- 2) Au laboratoire, l'échantillon a été filtré sur un filtre de type GF/F afin d'éliminer le phytoplancton et le zooplancton.
- 3) Puis l'échantillon pré-filtré est ultrafiltré avec une cassette d'ultrafiltration (100 kDa ; Vivaflow, *Vivasciences*). Ceci ramène le volume initial de 20 L à un volume final d'environ 200 ou 100 ml, appelé « concentré » ou « viral lysate ».
- 4) L'échantillon ultrafiltré est placé au réfrigérateur (stockage pendant plusieurs mois possible)



-ANNEXE II-

II. EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ADN  
EUBACTERIEN

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. [Massana, 1997 #450].

**II. 1. Extraction de l'ADN eubactérien**

- 1) Chaque microtube contenant le filtre à analyser, reçoit 750 µL de tampon de lyse (Lysis buffer : 40 mM EDTA, 5 0mM Tris-HCl and 0,75 M Sucrose, conservé au congélateur).
- 2) 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
- 3) Ces échantillons sont ensuite vortexés et centrifugés à maximum vitesse pendant quelques secondes (GC-15R Centrifuge, Beckman) : speed-down
- 4) 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).
- 5) speed-down
- 6) 75 µL de SDS 10 % (température ambiante ; agent dénaturant des protéines et lipides membranaires) et 10 µL de protéinase K (32 UmAnson / mg, *Eurobio*, conservé au congélateur) sont ajoutés.



- 7) Les eppendorfs sont mis pendant 1h30 dans un bain marie à 55°C
- 8) Speed-down

## **II.2. 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.

- 1) Les échantillons sont transférés sans le filtre dans des microtubes de 2 mL.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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 (voir Annexe III).

-ANNEXE III-

PRECIPITATION ET SOLUBILISATION DE L'ADN

Cette étape purifie/concentre des solution d'ADN ou des produits de PCR

- 1) 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
- 2) On ajoute 200% de volume d'éthanol absolu froid (conservé à -20°C). Mélanger par inversion du tube.
- 3) Les échantillons sont placés debout, au congélateur à -80°C pendant la nuit
- 4) Centrifuger tous les échantillons pendant 30 minutes à 21.000 g à 4°C.
- 5) Jeter le surnageant
- 6) 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
- 7) Les tubes sont re-centrifugés pendant 10 min à 21.000 g à 4°C
- 8) Répéter l'étape 5)
- 9) Le culot est ensuite séché au speed-vac (Speed vac, Savant) pendant 20 à 40 minutes
- 10) 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)
- 11) Afin de solubiliser l'ADN, les tubes sont placés au bain marie pendant 2 h à 37°C



## -ANNEXE IV-

# DOSAGE DE LA QUANTITE D'ADN EUBACTERIEN PAR SPECTROMETRIE

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.

### IV. 1. 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 DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> doit être compris 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.

### IV.2. Protocole

1. 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
2. Une dilution de l'échantillon est effectuée avec la même eau stérile au 1/80<sup>ème</sup> : prélever 1 µl d'ADN et ajouter 79 µl d'eau, bien mélanger

3. Charger tout le volume à l'intérieur de la cuve spectrophotométrique et lire les valeurs de DO, de rapport et de pureté
4. 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)

## -ANNEXE V-

### AMPLIFICATION PAR PCR

#### V. 1. 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 2<sup>n</sup> fois.

#### V.2. Préparation des solution 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 µM concentration finale): une solution de 800 µL est préparée avec 100 µl de la solution stock de 100 µM) et 700 µl du tampon TE ou de l'eau stérile. Conserver au congélateur.

-dNTP (Pharmacia)

10 µL de chaque nucléotide (A, G, C, T) sont mélangés avec 460 µl 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.

### V. 3. Protocole détaillé

- 1) 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)
- 2) Faire un speed-down rapide de tous les ingrédients conservés au congélateur et les poser sur de la glace
- 3) Distribuer les échantillons d'ADN dans des tubes à PCR (1 µl ici)
- 4) Préparer un mélange de tous les réactifs dans un eppendorf stérile pour obtenir un volume réactionnel de 50 µl (25 µl ou voir 100 µl) \* 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 µl et un échantillon :

**Tab.5.** Exemple de composition du mélange utilisé en PCR pour un échantillon et un volume réactionnel de 50 µl (-1µl d'ADN).

| Ingrédients   | Volume (en µL) | Concentration finale        |
|---|----------------|-----------------------------|
| Eau stérile**   | 28,75          |                             |
| Tampon 10X ( <i>Eurobio</i> )                                 | 5              |                             |
| dNTP  | 3              | 120 µM de chaque nucléotide |
| MgCl <sub>2</sub> ( <i>Eurobio</i> )                          | 1,5            | 1,5 mM                      |
| Amorce sens (12.5µM)  | 4              | 1 µM                        |
| Amorce antisens (12.5µM)                                      | 4              | 1µM                         |
| BSA***  | 2,5 µL         | 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 remplacé par de l'eau stérile.

**Tab. 6.** Amorces utilisées : P81-P92 pour clonage-séquençage de cyanophages; P94-P92 pour DGE sur cyanophages; P75-P78 pour clonage-séquençage d'eubactéries ; P78-P79 pour DGE sur eubactéries. Les chiffres en gras correspondent à nos appellations.

| Nom de l'amorce       | Séquence (5'-3')  | Référence bibliographique   |
|-----------------------|---|---|
| <b>P81</b> ou CPS1    | GTAG[T/A] ATT TTC TAC ATT GA[C/T]<br>GTT GG   | Fuller et al. [Fuller, 1998 #631]   |
| <b>P75</b> ou 358     | CCT ACG GGA GGC AGC AG  | Muyzer et al. [Muyzer, 1993 #343]   |
| <b>P78</b> ou 358GC*  | GCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC<br>CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA<br>GGC AGC AG                    | Muyzer et al. [Muyzer, 1993 #343]   |
| <b>P79</b> ou 907RM*  | CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT  | Schauer [Schauer, 2003 #771]  |
| <b>P94</b> ou CPS1-GC | CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC<br>CCG CCG CCC CCG CCC G GT AG[T/A]<br>ATT TTC TAC ATT GA[C/T] GTT GG | Fuller et al. ([Fuller, 1998 #631]<br>pour CPS1)<br>Dorigo (2004) pour CPS1GC |
| <b>P92</b> ou CPS8    | AAA TA(C/T) TT(G/A/T) CCA ACA (A/T) AT<br>GGA   | Zhong et al. [Zhong, 2002 #619]   |

\**Escherichia coli* position

- 5) Bien mélanger tous les ingrédients du mix
- 6) Pour un volume réactionnel de 50 µl, répartir dans chaque tube à PCR 49 µl du mix et mélanger soigneusement
- 7) Places les tubes dans le thermocycleur (Thermal Cyler T-Personal, *Biometra*) et choisir le programme

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. e. (1990). PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego CA.





**-ANNEXE VI-****ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE****VI.1. Principe**

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.

**VI.2. Protocole**

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 (Tab.7). En général, plus petit est le fragment d'ADN, plus fort sera le pourcentage d'agarose.

**Tab.7.** Pourcentage d'agarose conseillé pour l'analyse de tailles différentes d'ADN.

| Taille des fragments d'ADN | % d'agarose dans le gel           | 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**

- 1) Peser 0,5 g **d'agarose**
- 2) Mesurer 50 mL de tampon TBE 0.5X et mélanger à l'agarose
- 3) Faire bouillir 45 seconds aux micro-ondes
- 4) Refroidir à 50 °C
- 5) Préparer le moule d'électrophorèse

- 6) 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.
- 7) Couler le gel dans le moule
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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)
- 11) Faire migrer pendant 30 minutes au minimum à 100 volts
- 12) Arrêter la migration
- 13) Observer le gel à la plaque UV (TEX-35M, *Bioblock Scientific*)
- 14) Une photo numérique est prise (*Kodak DC290*) et sauvegardée (*Edas 290, Kodak*)
- 15) 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 :

1. Déposer 5 µl de produit PCR avec du GBL dans un puit du gel
2. 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)
3. 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

-ANNEXE VII-  
LA DGGE (DENATURING GRADIENT GEL  
ELECTROPHORESIS)

## VII. 1. Principe

Initialement, cette technique a été développée dans le domaine médical pour détecter des mutations impliquées dans des maladies génétiques. Aujourd'hui cette technique est largement utilisée pour distinguer les différentes populations de micro-organismes dans des échantillons naturels après amplification de leur ADN 16S (Muyzer, 1993 ; #192). Cette technique permet la comparaison d'échantillons différents 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 (Fischer et Lian, 1979). 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  $T_m$  (température de fusion) qui variera selon les domaines et qui sera 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 séquence et donc de  $T_m$  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 complète séparation 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 Tm) et dans la préparation du gel (pourcentage de gel, gradient de dénaturation, tension et durée d'électrophorèse).

Nous avons utilisé la technique de DGGE dans nos études de biodiversité de communauté eubactériennes (suite à amplification du 16S) et des communauté de cyanophages (un gène conservé chez les cyanophages). Lors de l'analyse d'une communauté complexe, des profils multi-bandes sont obtenus et chaque bande est représentative d'une séquence et donc d'un phylotype. Le nombre de bandes nous renseigne 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.

## VII. 2. Protocole

### VII. 2. 1. PCR de 50 µl de volume réactionnel

Faire une amplification en PCR de tous les échantillons qui vont être comparés par DGGE (utiliser toujours le même type d'appareil à PCR, la même *Taq*, le même programme, la même recette de PCR, etc..)

- Faire une dilution de l'ADN mère de façon à obtenir 2 ng/µl (entre 1 et 30 ng).
- Déposer 1 µl de cette solution d'ADN bactérien dans un microtube à PCR. Dans le cas de cyanophages, 20 µl de « viral lysate » (ca.  $1 \cdot 10^7$  part/mL), stocké au frigo, suffissent.
- Calculer le volume de chaque ingrédient nécessaire à la PCR en tenant compte du numéro total d'échantillons à amplifier et préparer le mix d'un volume réactionnel de 50 µL

**Tab. 8.** Composition du mélange pour PCR pour une analyse de diversité eubactérienne en DGGE. Ici les volumes suffisent pour un échantillon.

| Ingrédients                    | Volume à ajouter | Concentration finale |
|--------------------------------|------------------|----------------------|
| Eau stérile                    | 28,75 µl         |                      |
| 10X PCR tampon (Eurobio)       | 5 µ              |                      |
| MgCl <sub>2</sub> (Eurobio)    | 1,5 µl           | 1.5 mM               |
| dNTPs                          | 3 µl             | 120 µM chacun        |
| Amorce P78 (12.5µM)            | 4 µl             | 1 µM                 |
| Amorce P79 (12.5µM)            | 4 µl             | 1 µM                 |
| BSA                            | 2.5 µl           | 0.5 mg/mL            |
| Taq DNA (eurobluetag, Eurobio) | 0.25µl           | 1.25 U               |

- Dans le cas d'ADN bactéries, distribuer 49 µl du mix dans chaque tube à PCR contenant 1µL d'ADN bactérien et mélanger
- Placer les tubes à PCR dans le thermocycleur et choisir le programme « BactDGG »

**Tab. 9.** Composition du mélange pour PCR (mix de 50 µl) pour une analyse de diversité des cyanophages en DGGE. Ici les volumes suffisent pour un échantillon.

| Ingrédients                            | Volume à ajouter | Concentration finale        |
|--|------------------|-----------------------------|
| Eau stérile ( <i>Eurobio</i> )         | 6,75 µl          |                             |
| 10X PCR tampon ( <i>Eurobio</i> )      | 5 µl             |                             |
| MgCl <sub>2</sub> ( <i>Eurobio</i> )   | 2,5 µL           | 2,5 mM                      |
| dNTPs                                  | 5 µL             | 200 µM de chaque nucléotide |
| Amorce P92 (12.5µM)                    | 4 µL             | 1 µM                        |
| Amorce P94 (12.5µM)                    | 4 µL             | 1 µM                        |
| BSA ( <i>Sigma</i> )                   | 2,5 µL           | 0,5 mg/mL                   |
| Taq DNA (eurobluetag, <i>Eurobio</i> ) | 0,25 µL          | 1,25U                       |

- Dans le cas d'analyse de cyanophages, distribuer 30 µl du mix dans chaque tube à PCR contenant 20 µl de viral lysate et mélanger
- Placer les tubes à PCR dans le thermocycleur et choisir le programme « CPSGC »

-Caractéristiques des amorces utilisées pour amplifier la région d'ADN d'intérêt.

**Tab. 10.** Caractéristiques des amorces utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité eubactérienne (P78-P79) et de la diversité de cyanophages (P92-P94). Les chiffres en gras correspondent à nos appellations au laboratoire.

| Nom de l'amorce       | Séquence (5'-3')  | Référence bibliographique                                 |
|-----------------------|---|---|
| <b>P78</b> ou 358GC*  | GCG CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC<br>CCG CCG CCC CCG CCC G CCT ACG GGA<br>GGC AGC AG                    | Muyzer (1993)   |
| <b>P79</b> ou 907RM*  | CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT  | Schauer (2003)  |
| <b>P94</b> ou CPS1-GC | CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC<br>CCG CCG CCC CCG CCC G GT AG[T/A]<br>ATT TTC TAC ATT GA[C/T] GTT GG | Fuller et al. (1998) pour CPS1<br>(article V) pour CPS1GC |
| <b>P92</b> ou CPS8    | AAA TA(C/T) TT(G/A/T) CCA ACA (A/T) AT<br>GGA   | Zhong et al. (2002)                                       |

\*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.

**Tab.11** . Caractéristiques du programme utilisées 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<br>(-1°C/cycle) | 1 min à 55°C |              |
| Elongation       |              | 3 min à 72°C                 | 3 min à 72°C |              |

**Tab.12.** Caractéristiques du programme utilisées pour l'analyse en DGGE de la diversité de cyanophages.

|                  | Première boucle | Deuxième boucle                      | Quatrième boucle |
|------------------|-----------------|--------------------------------------|------------------|
| Nombre de cycles | 1 cycle         | 35 cycles                            | 1 cycle          |
| Dénaturation     | 3 min à 94°C    | 15 sec à 94°C                        | 4 min à 73°C     |
| Hybridation      |                 | 15 sec à 46°C<br>(ramping 0.3°C/sec) |                  |
| Elongation       |                 | 1 min à 73°C                         |                  |

### VII.2.2. Electrophorèse en gel d'agarose

Après amplification en PCR, la qualité et taille des fragments sont vérifiées par électrophorèse en **gel d'agarose** à 1% et coloré au bromure d'ethidium.

- Mélanger une goutte de GBL5X avec 4 µl de produit PCR dans le cas des eubactéries et 13 µl dans le cas des cyanophages. Charger dans le gel d'agarose et ajouter à chaque rangé un marqueur de taille (100 pb, *Invitrogen* 1µg/µL). Migration pendant 30 min à 100volts. Prendre une photo du gel sous rayons UV.

Remarque : Le couple d'amorces utilisé pour amplifier la région d'intérêt des eubactéries produira un fragment de 550 pb, celui utilisé pour les cyanophages, un fragment de 630 pb.

### VII.2.3. Quantification des produits de PCR par électrophorèse

Voir Annexe 6 pour plus de détails

### VII.2.4. Préparation des solutions 'mères'

Pour plus de détails consulter l'Annexe 11.

- 20% APS : 0,2 g/mL (dans des aliquotes stockées au congélateur)
- Solutions stock à 6 % d'acrylamide (dans frigo) de 0 et 80 % de dénaturants
- Solution 20X TAE (température ambiante)

### VII.2.5. Préparation des plaques à DGGE (Système CBS Scientific)

- Avant de préparer les plaques, préparer deux supports en plastique (ex. deux boîtes à cônes)

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



## VII.2.6. Préparation du système à DGGE

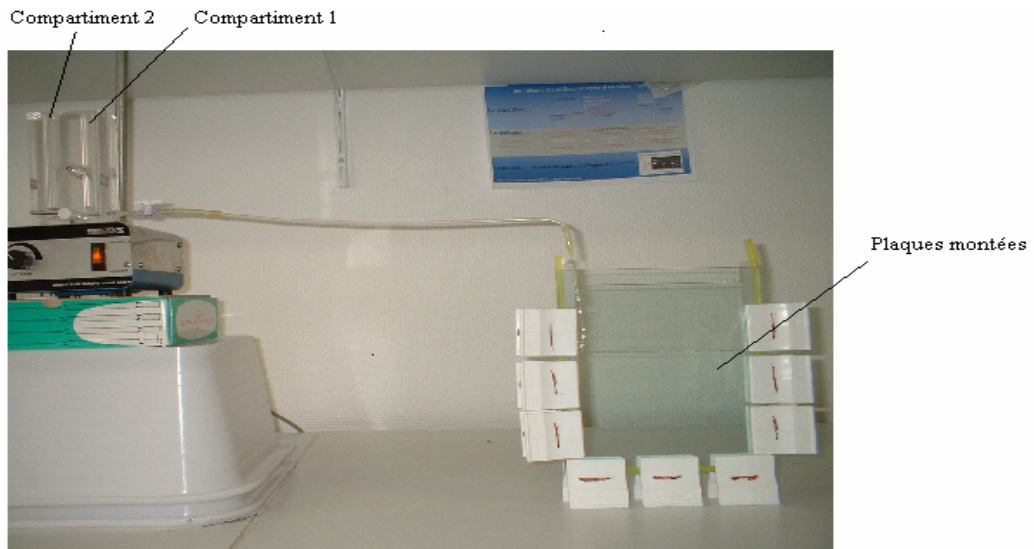
### VII.2.3.6.1. Préparation du gel sandwich

- Pour les gels d'1 mm d'épaisseur, prendre le joint rouge (pour 0,75 mm le joint jaune), positionner les fentes au niveau des coins arrondis de la plaque, coté le plus large doit être mis sur l'extérieur
- 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 les pinces les plus fines 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

### VII.2.3.6.2. 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



**Fig. 23.** Photo du système d'écoulement

### VII.2.7. 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 correspondent 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), alors qu'un gradient de 30 à 70% a été utilisé dans le cas des cyanophages.

-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 (Tab.13) et de 0.75 mm d'épaisseur (Tab.14) :

**Tab.13.** 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.

| <i>Les sol.s filles</i> | 80% sol. mère | 0% sol. mère | Temed | APS   | GBL 5X |
|-------------------------|---------------|--------------|-------|-------|--------|
| <i>0</i>                |               | 6 mL         | 6 µl  | 30 µl |        |
| <i>40</i>               | 6 mL          | 6 mL         | 11 µl | 60 µl |        |
| <i>80</i>               | 12 mL         |              | 11 µl | 60 µl | 80 µl  |

**Tab.14.** 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.

| <i>Les sol.s filles</i> | 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  |

-Pour l'analyse de la diversité de cyanophages dans un gradient de 30 à 70% voici les détails pour la constitution de trois solutions de denaturation filles et cela pour un gel de 1 mm d'épaisseur (Tab.15.) :

**Tab.15.** Composition d'un gel de 1 mm d'épaisseur et contenant un gradient de 30-70% (analyse de diversité de cyanophages). Le 0% servira à remplir le haut du gel.

| <i>Les sol.s filles</i> | 80% sol. mère | 0% sol. mère | Temed | APS   | GBL 5X |
|-------------------------|---------------|--------------|-------|-------|--------|
| 0                       |               | 6 mL         | 6 µl  | 30 µl |        |
| 30                      | 4,5 mL        | 7,5 mL       | 11 µl | 60 µl |        |
| 70                      | 10,5 mL       | 1,5 mL       | 11 µl | 60 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
  - distribuer le 0% mère et puis le 80%
  - ajouter le TEMED,
  - ajouter l'APS dans les solutions 40% et 80 %
  - inverser une fois les tubes afin de mélanger le contenu

### VII.2.8. Coulage 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.

### **VII.2.9. Préparation de la migration**

Quant le gel sera polymérisé et le tampon du bac sera 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

**VII.2.10. 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  $\mu$ l) 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 si les échantillons sont rentrés dans la matrice du gel. Si oui, enlever le régulateur du flux

La migration durera 16 h (à 100 volts) dans le cas des eubactéries (Schauer et al., 2000) et des cyanophages (article V)

**VII.2.11. 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  $\mu$ l de SYBRGold (1 : 5.000 concentration finale ; SYBRGold conservé dans des aliquotes de 30  $\mu$ l 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 contrast afin d'optimiser l'image

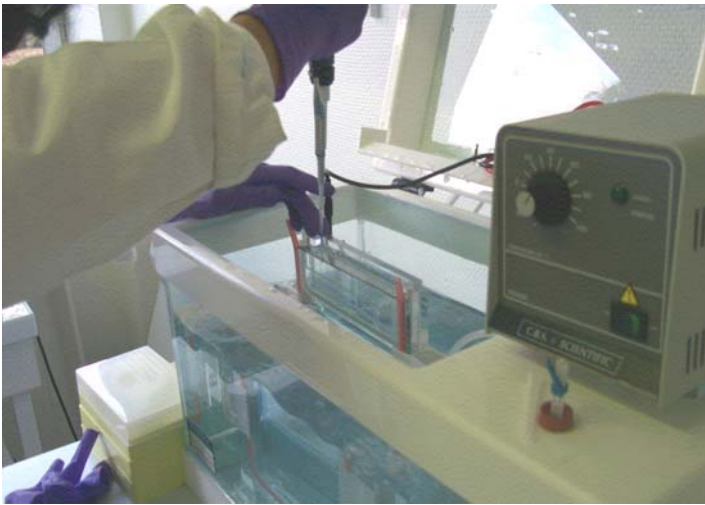
### VII. 3. Analyse des gels de DGGE

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.



1) Dépôt des échantillons dans les puits d'un gel de DGGE

2) La cuve à DGGE contenant le système de gel



3 A et B : Décollage des deux plaques afin de récupérer le gel contenu à l'intérieur de ce sandwich en fin de migration.

Fig. 24 A, B, C et D. Photos de quelques étapes en DGGE

## -ANNEXE VIII- LA TECHNIQUE DE CLONAGE

### VIII.1. Principe du clonage

Le clonage des produits de PCR est l'étape préalable au tri des séquences amplifiées. En pratique le clonage débute avec en une première phase, appelée la **ligation** : un fragment d'ADN est inséré dans un vecteur (plasmide pour des fragment <1,5 kpb ; phage pour des fragments de grande taille). Ensuite, le vecteur recombiné est inséré à l'intérieur d'une cellule hôte (bactérie *E. coli*) : étape de **transformation**. Ces cellules hôte transformées seront mises en culture pour produire plus de cellules, donc plus d'ADN inséré.

### VIII.2. Protocoles

#### VIII.2.1. Protocole de ligation

La ligation est réalisée à l'aide d'un kit de ligation de Promega (conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) selon les indications du fournisseur. Brièvement :

- 1) Un eppendorf qui contiendra les ingrédients du mix de ligation. Les ingrédients du mix seront multipliés par le nombre d'échantillons.

**Tab. 16.** Composition du mix de ligation pour un échantillon.

| Composants     | Volume (en $\mu\text{L}$ ) |
|----------------|----------------------------|
| Eau stérile    | 2                          |
| pGEM (vecteur) | 1                          |
| Tampon 2X      | 5                          |
| ADN ligase T4  | 1                          |

- 2) Distribuer 9  $\mu\text{l}$  de ce mix dans des tubes à PCR
- 3) Ajouter 1  $\mu\text{l}$  d'ADN (produit PCR) à la bonne concentration (calculer la quantité exacte selon la formule dans le manuel du kit) et bien mélanger.
- 4) Laisser une nuit au moins à  $4^{\circ}\text{C}$



### VIII.2.2. Protocole de transformation

Suite à la ligation, le vecteur recombiné (plasmide contenant le fragment inséré) est inséré dans une bactérie rendue compétente. Une cellule est dite compétente, quant elle est apte à accepter un ADN étranger. Pour repérer à la fin de l'expérimentation, les cellules ayant incorporé le vecteur recombiné, un plasmide possédant deux marqueurs est utilisé. Les marqueurs sont un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline, et un gène bêta-galactosidase. La culture des bactéries se fait sur un milieu sélectif contenant de l'ampicilline et un substrat (X-gal + IPTG) de la bêta-galactosidase. Seules les bactéries ayant incorporé le plasmide pousseront car elles sont résistantes à l'ampicilline. Les colonies bactériennes auront une couleur blanche ou bleue selon si elles contiennent le plasmide recombiné ou pas. Le fragment s'insère dans un endroit spécifique du plasmide en inhibant la transcription du gène de la bêta-galactosidase, le substrat X-gal ne sera pas dégradé, conférant aux cellules une couleur blanche.

### VIII.2.3. Préparation des boîtes de culture

Les boîtes de cultures serviront à la mise en culture des cellules transformées.

- Ajouter 15 g d'agar (conservé à température ambiante) à un litre de milieu LB (conservé au frigo) et autoclaver le mélange à 121 °C pendant 20 minutes.
- Sous hotte stérile : Après refroidissement du milieu (50°C), ajouter 1 ml d'ampicilline (stocké au congélateur dans des aliquotes, concentration finale de 100 mg/L). Verser 30-35 mL de milieu dans des boîtes pétrie et laisser solidifier

### VIII.2.4. Préparation et utilisation des cellules d'*E.coli*

- Mettre la solution SOC (conservé au frigo), les boîtes de cultures à température ambiante et bain marie à 42°C
- Décongeler la quantité de bactéries nécessaires au protocole (50 µl par échantillon)
- Déposer les bactéries (JM109) et les produits de ligation dans la glace pilée (5 min)
- Mélanger très doucement les bactéries avec l'embout de la pipette
- Dans des tubes eppendorf, mettre 50 µl de bactéries et 2 µl de produit de ligation, mélanger
- Laisser 20 minutes dans la glace
- Les tremper 50 secondes dans un bain-marie à 42°C
- Les déposer dans la glace pendant 2 minutes

- Ajouter 600 µl de milieu SOC (opération stérile) à température ambiante
- Incuber pendant 1h30min à 37°C à l'étuve, couchés, avec une faible agitation (entourer l'ependorf avec du parafilm pour éviter l'évaporation)
- Pendant ce temps, étaler sur chaque boîte de Pétri 20 µl de X-GAL (Eurobio, au congélateur) et 100 µl d'IPTG (Eurobio, au congélateur) préalablement mélangés
- Laisser bien imprégner ces produits pendant 30 minutes-1heure
- Déposer le mélange bactéries-SOC sur chaque boîte
- Laisser les boîtes une nuit à l'étuve à 37°C

### VIII.2.5. Amplification de l'ADN par PCR sur clone

Une colonie blanche d'*E. coli* représente un ensemble de cellules à même patrimoine génétique (clone), caractérisé par la présence d'un seul type de fragment qui avait été amplifié en PCR avant le clonage. Afin de re-extraire ce fragment, l'ADN de ce clone est récupéré en PCR comme suit. Les amorces (SP6 et T7), utilisées cette fois-ci, ciblent des régions à gauche et à droite du fragment inséré. Il est nécessaire de préparer un mix (mélange) en multipliant les volumes de chaque ingrédient par le nombre d'échantillons plus un pour le témoin négatif

**Tab. 17.** Composition du mix PCR pour un échantillon et un volume réactionnel de 50 µl, utilisé pour la PCR sur clone.

| Ingrédients       | Volumes (en µL) |
|-------------------|-----------------|
| Eau distillée     | 28,75           |
| Tampon 10X        | 5               |
| MgCl <sub>2</sub> | 1,5             |
| dNTP              | 3               |
| Amorce SP6        | 4               |
| Amorce T7         | 4               |
| Taq polymérase    | 0,25            |

- 50 µL de ce mix sont distribués dans des tubes à PCR de 0,2 mL
- Piquer un clone avec un cône de 10 µL et rincer ce cône dans chaque tube à PCR
- Placer les tubes au thermocycleur et choisir le programme

**Tab. 18.** Programme PCR utilisé pour amplifier en T7 et SP6 (suite à clonage).

|                  | Première boucle | Deuxième boucle | Troisième boucle |
|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Nombre de cycles | 1 cycle         | 30 cycles       | 1 cycle          |
| Dénaturation     | 5 min à 94°C    | 50 sec à 92°C   | 10 min à 72°C    |
| Hybridation      | 1 min à 55°C    | 50 sec à 55°C   | 24 heures à 4°C  |
| Elongation       | 1 min à 72°C    | 55 sec à 72°C   |                  |

- A la fin du cycle PCR la nature et taille du fragment inséré seront vérifiées en chargeant 5 µl avec du GBL dans un gel d'agarose à 1%.

---

-ANNEXES IX-

LA TECHNIQUE DE SEQUENÇAGE

### IX.1. Principe

Le séquençage de l'ADN est généralement effectué par la méthode enzymatique appelée la **méthode de Sanger** : le principe repose sur l'incorporation de didésoxynucléotides. A ce principe de séquençage a été couplée une réaction de PCR afin d'amplifier le signal de séquençage. Une enzyme analogue à la Taq polymérase, est thermostable et produit une série de molécules d'ADN dont les longueurs une fois ordonnées forment une suite arithmétique croissante que l'on peut séparer suivant leur taille par électrophorèse. En fait, cette méthode enzymatique de terminaison des chaînes par un didésoxy permet de déterminer la séquence des bases de l'ADN à séquencer (ADN matrice) en identifiant la base terminale de chaque molécule synthétisée de la plus courte à la plus longue. L'ADN matrice ne doit contenir que des molécules d'ADN ayant la même séquence c'est pour cela que l'on utilise de l'ADN cloné ou produit par PCR sur un seul type de fragment.

Un milieu réactionnel est préparé : l'ADN matrice sous forme simple brin, de l'ADN polymérase, un amorce par réaction de séquençage, quatre didésoxynucléotide triphosphate (ddNTP) contenant chacun un fluorochrome différent. Ces ddNTP sont analogues aux quatre bases de l'ADN (dNTP) mais différents de ceux-là par l'absence de groupe hydroxyle sur le carbone 3' du sucre. Cette absence de l'hydroxyle en 3' empêche l'extension supplémentaire de la double hélice en formation. Les ddNTP jouent donc un rôle d'inhibiteurs de la synthèse de l'ADN. Dans le milieu une série de molécules d'ADN de différentes longueurs sont produites qui ont été stoppés à différents moments de l'extension. A l'issue de la réaction de séquençage, les molécules d'ADN synthétisées sont séparées suivant leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (6 à 8%) en condition de dénaturation (urée). Les séquences sont donc séparées en fonction de leur taille ; les brins les plus courts migrent plus rapidement. Un faisceau de laser de longueur d'onde 594 nm traverse le gel dans sa largeur et excite les fluorochromes qu'il rencontre. Les photodiodes enregistrent l'intensité lumineuse émise à 612 nm par les fluorochromes excités. Le signal est numérisé et transmis à l'ordinateur qui enregistre et analyse les données. On obtient un chromatogramme par puits présentant des pics colorés correspondant chacun à un des quatre ddNTP.

## IX.2. Préparation des échantillons pour le séquençage

Après l'étape de clonage, de récupération des fragments insérés par PCR sur clones et vérification de la nature et taille du fragment par électrophorèse, la véritable étape de séquençage commence

- 1) Les produits PCR positives sont purifiés avec le « QIAquick **PCR purification Kit Protocol** ». Cet étape purifie un simple ou double brin d'ADN (entre 100 pb et 10 kpb) des amorces, des polymerases, des sels. Suivre les conseils du fournisseur
- 2) La nature, taille et abondance des fragments purifiés sont vérifiées par une **électrophorèse d'agar à 1%** (voir Annexe 6).
- 3) Les produits PCR sont maintenant soumis à la **réaction de séquençage** avec le Kit ABI PRISM Dye Terminator (Ampli Taq FS référence). La quantité d'ADN recommandée par réaction de séquençage, dépend du type d'ADN à séquencer :

|                      |            |
|----------------------|------------|
| ADN simple brin      | 50-100 ng  |
| ADN double brin      | 100-500 ng |
| Fragment PCR purifié | 30-90 ng   |

La réaction de séquençage consiste en l'ADN matrice, une amorce (SP6 ou T7 à l'occurrence : 4 µl), du mix réactionnel (8 µl) et de l'eau (qsp 20 µl):

### Lancer la réaction de séquençage à la PCR

- 96°C 30 seconds (dénaturation de la double hélice)
  - 50°C 15 seconds (hybridation de l'amorce)
  - 60°C 4 minutes (extension et arrêt quand le premier ddNTP sera incorporé)
  - 25 cycles puis maintenir à 4°C
- 4) Suite à la réaction de séquençage, les échantillons subissent une **purification des produits d'extension et de dénaturation**. Nous avons utilisé le KIT de Qiagen ou de Amersham. Suivre les indications des fournisseurs
  - 5) **Lyophiliser** les échantillons : 15 minutes à température moyenne. Si nécessaire mettre au congélateur
  - 6) **Dénaturer** les échantillons :
    - ajouter 5 µl de tampon de charge séquençage (5 : 1 formamide dé-ionisée et 50 mM EDTA) et mélanger ; mettre à 90°C à bain marie 2 minutes

- Tout de suite dans la glace pour éviter que les doubles brins s'hybrident à nouveau et speed down une fois refroidis.
- Charger dans les deux heures qui suivent, sinon refaire la dénaturation

### **IX.3. Préparation des plaques et du gel de séquençage**

#### **IX.3.1. Préparation des plaques**

- Laver les plaques, les spacers, le peigne et l'empreinte avec et dans l'ordre
  - l'eau chaude normale et de liquide vaisselle
  - l'eau permutée
  - l'eau ultrapure
- Mettre les plaques dans l'étuve à sécher, Essuyer les spacers et le reste

#### **IX.3.2. Assemblage des plaques**

- Positionner la plaque carrée sur le système de chargement inclinable
- Incliner le système
- Positionner les spacers de 0.4 mm d'épaisseur sur la plaque
- Positionner la plaque « notched » sur cet ensemble afin de former le gel sandwich
- Pincer le sandwich avec 3 pinces sur chaque coté

#### **IX.3.2. Préparation du gel d'acrylamide de 0,4 mm (70 ml de gel : 4,75 %, acryl/bisacryl 19/1)**

- Filtrer à travers 0,2 µm 150 ml de TBE 10X
- Peser dans un Erlen 35 g d'urée
- Ajouter 7,9 mL (= 2 fois 3,95 mL) de solution d'acrylamide à 40 % et 8,3 mL bisacrylamide à 2 %
- Boucher avec un morceau de parafilm
- Mélanger continuellement et dissoudre sous l'eau chaude. Si la dissolution est difficile, ajouter 5 mL d'eau stérile
- Verser le mélange dans une éprouvette
- Ajouter 7 mL de TBE (10X), préalablement filtré sur autre unité de filtration
- Compléter à 70 mL avec de l'eau stérile
- Filtrer sur 0,2 µM nitrate de cellulose (unité de filtration Nalgène)
- Dégazer en attendant de couler le gel

- Ajouter 350  $\mu$ L d'ammonium persulfate à 10%
- Ajouter 40  $\mu$ L de TEMED.
- Couler le gel par moyen d'une seringue au niveau de l'emplacement prévu pour le peigne et faire couler doucement le gel entre les 2 plaques. Eviter la formation des bulles
- Quand le gel commence à sortir en bas du gel sandwich, remplir l'espace qui sera réservé à l'empreinte du peigne, mettre les plaques à plat, poser l'empreinte du peigne et le maintenir avec les 3 meilleurs pinces
- Laisser polymériser le gel pendant 1h30min à 2h

#### **IX.4. Installation des plaques et démarrage**

- Retirer les pinces latérales du gel sandwich
- Nettoyer avec de l'eau ultrapure l'extérieure des plaques, surtout là où le laser passe (partie inférieure)
- Placer le gel sandwich dans l'étuve à sécher
- Contrôler les paramètres au séquenceur : Filter A, 14h, Volt 2500, mAMP 40 et Watt 32
- Ouvrir la porte du séquenceur et installer de la bassine d'électrophorèse inférieure
- Installer les plaques dans le séquenceur et fixer les plaques au séquenceur
- Fermer la porte
- Faire un premier scan : Start Pre-run, Plate Check, Full scan
- La ligne bleu doit être la plus basse des lignes colorées (entre la valeur 800-1000) et le rouge la plus haute (1600) : sinon modifier la valeur de PMT: Main menu, Abort, Calibration, Configuration et chercher PMT (si haut, baisser voltage et revenir Main menu)
- Refaire Start Pre-run .....Stop
- Enlever tous les pinces restantes
- Installer la "bassine" en haut et les plaquettes et fixer l'ensemble
- Broncher les électrodes
- Mélanger le TBE préalablement filtré sur 0.2 $\mu$ m (180 mL du 10X, dilué 10 fois avec de l'eau ultrapure ou permutée)
- Ajouter cette solution tampon TBE (1X) dans la bassine en haut et en bas

- Retirer l'empreinte du peigne
- Laver avec du TBE le peigne de 0.4 mm et l'installer et l'enfoncer de 2-3 mm
- Rincer avec du TBE chaque puit et fermer la porte du séquenceur
- Faire un Pre-run -Pre-run Gel (au démarrage le voltage est compris entre 1300-1700V) pendant 10 à 30 minutes
- Remplir la feuille de route (ev Finder -Data collection ; Edit-Settings; et indiquer les paramètres du séquençage (temps, opérateur, peigne,...)
- Stop pre-run
- Charger les échantillons dans les puits impairs ; 6 µl suffisent (Remarque : Quant on charge, toujours mettre quelque chose dans le puit numéro 1. Mettre dans le puits zéro du tampon de charge
- Faire un Pre-run de 5 min et contrôler la plaque (plate check)
- Charger les échantillons pairs et Pre-run pendant 5 minutes
- Remettre du tampon dans la bassine supérieure si le niveau a baissé
- Commencer la migration : Choose run-Seq-Full scan
- Sur ordinateur : Cliquer dans l'icône « Collect » de la fenêtre

#### **IX.4. Analyse des séquences**

Après migration les séquences sont vérifiées afin d'éliminer d'éventuelles erreurs de lecture. Les résultats apparaissent sous forme d'un chromatogramme où chaque pic de couleur différente est associé à une des 4 bases.

Les séquences sont alignées et assemblées avec le programme GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997). Les séquences chimeriques sont identifiées avec le programme Bellerophon (Huber et al., 2004) ou le programme Chimera Check du projet RDPII (Cole et al., 2005) et éliminées. Ensuite, les séquences nucléotidiques sont identifiées en cherchant des séquences homologues dans des banques de données (RDPII et NCBI pour les séquences d'ARN ribosomique ; GenBank pour tous les séquences). L'analyse phylogénétique est réalisée ensuite en construisant un arbre phylogénétique avec Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) sur des distances de Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969) avec le programme PHYLIP (Felsenstein, 1993). Le taux de confiance des arbres phylogénétiques à été évalué en effectuant 500 répliques. L'arbre phylogénétique est représenté avec le programme TreeView (Page, 1996). Nous avons défini un OTU comme un groupe de séquences similaires à 95%.



**Les références citées dans l'Annexe XI :**

- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M. and Tiedje, J. M., (2005). The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* **Jan 1 ;33 (Database Issue):D294-D296. doi: 10.1093/nar/gki038.**
- Felsenstein, J., (1993). *Phylogenetic inference programs (PHYLIP), Manual 3.5c.* University of Washington, Seattle, Washington.
- Huber, T., Faulkner, G. and Hugenholtz, P., (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics Applications Note* **20(14).**
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism.* H. N. Munro. New York, Academic Press. **3:** 21-132.
- Nicholas, K. b. and Nicholas, H. B. J. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author, ([www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml](http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml)).
- Page, R., (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12:** 357-358.
- Saitou, N. and Nei, M., (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol* **4:** 406-425.

## -ANNEXE X-

COMPTAGE DE BACTERIES HETEROTROPHES ET DE VIRUS  
PAR CYTOMETRIE EN FLUX**X.1. Principe de la cytométrie en flux (CMF)**

Cette technique est apparue dans les années 1980 pour détecter des anomalies dans les cellules animales et analyser le cycle cellulaire et est aujourd'hui couramment utilisée pour dénombrer les cellules (microorganismes) en suspension dans un liquide (jusqu'à 1000 cellules/particules par seconde). Différents signaux optiques permettent de mesurer différents paramètres cellulaires (cf. tableau 19) :

**Tab. 19.** Paramètres mesurés en CMF en fonction des signaux optiques analysés

| <b>Signaux optiques</b> | <b>Paramètre mesuré</b>                                   |
|-------------------------|---|
| Diffusion à petit angle | Taille cellulaire   |
| Diffusion à grand angle | Réfringence cellulaire                                    |
| Fluorescence            | Contenu en ADN, flux ioniques, potentiel transmembranaire |

La taille de cellules, le contenu en ADN, l'emploi de colorants ou plus récemment l'utilisation de sondes nucléaires ou d'anticorps spécifiques permettent de distinguer et de séparer les différentes populations contenues dans l'échantillon. Utilisé pour le comptage direct de cellules, cette technique très puissante et très rapide, permet également de suivre le métabolisme cellulaire (activité enzymatique par exemple) et d'effectuer un tri cellulaire et donc un isolement car la technique n'est pas destructive. La CMF atteint ses limites pour des échantillons où la répartition des cellules n'est pas homogène, où on retrouve des morphotypes filamenteuse, coloniales ou encore des nombreuses particules qui peuvent être confondues avec des particules virales ou cellules.

Pour être analysées, les cellules ou particules sont aspirées dans une gaine liquide à l'intérieur de laquelle elles sont entraînées dans un flux laminaire jusqu'à une chambre d'analyse. Dans celle-ci, les cellules alignées les unes derrière les autres passent une par une devant un faisceau laser qui excite les pigments ou marqueurs fluorescents, précédemment introduits. La lumière émise après excitation est amplifiée et sélectionnée au travers de filtres permettant au final de discriminer les populations en fonction de leurs caractéristiques

physiologiques et/ou de marquage [Jacquet, 2001 #375]. Certaines cellules, comme les organismes qui constituent le phytoplancton, sont fluorescentes naturellement si bien que l'excitation des pigments photosynthétiques suffit à discriminer des sous-populations. Dans le cas de cellules ou particules non fluorescentes, comme le cas des bactéries hétérotrophes et des virus, l'analyse est réalisée en utilisant des fluorochromes spécifiques de l'ADN, de l'ARN, des protéines. La majorité des cytomètres en flux sont capables d'analyser des paramètres relatifs à la taille, la forme, le volume, l'indice de réfraction des particules et trois niveaux de fluorescence : vert (éléments non fluorescents naturellement), rouge (fluorescence de la chlorophylle) et orange (fluorescence de la phycoérythrine).

Dans nos études, nous nous sommes limités au simple comptage de bactéries hétérotrophes et au comptage de particules virales grâce aux paramètres de fluorescence, verte et rouge, et de taille. Dans le cas des bactéries hétérotrophes et des virus, le SYBR<sup>®</sup> Green I (1/10.000 ; *Molecular Probes*) a été utilisé comme colorant des acides nucléiques. Après la préparation des échantillons les analyses ont été réalisées avec un cytomètre en flux de paillasse FACSCalibur (*Beckton Dickinson*). Les analyses sont faites à débit moyen (entre 60 et 70  $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

## **X.2. Préparation des échantillons pour comptage**

### **X.2.1. Protocole pour comptage de bactéries hétérotrophes**

#### X.2.1.1. Préparation de la solution de travail des billes :

Ajouter à 2,5 mL d'eau stérile 2,5  $\mu\text{l}$  de billes mères de 1  $\mu\text{m}$  de taille (*Molecular Probes*)

#### X.2.1.2. Préparation de la solution de travail de SYBRGreen I

Dans un eppendorf ajouter 5  $\mu\text{l}$  de la solution mère (10.000X *Molecular Probes*) et mélanger avec 500  $\mu\text{l}$  d'eau stérile. Congeler

#### X.2.1.3. Comptage de **bactéries** hétérotrophes par CMF

- 1 mL d'eau brute ou du filtrat ( $< 2 \mu\text{m}$ ) est prélevé et mis dans un eppendorf de 1,5 mL stérile
- 30  $\mu\text{l}$  de Formaldéhyde sont ajoutés dans chaque échantillon
- les échantillons sont placés à 4°C et analysés le jour même (ou 1 jour après)

- Disposer un nombre égal de tubes (Bd Falcon) que d'échantillons à analyser (plus un blanc) dans un portoir
- Mettre 0,5 µl de la solution fille de billes dans chaque tube
- ajouter 2,5 µl de solution de travail SYBRGreen I
- ajouter sur la parois du tube à coté de la première goutte de billes 2,5 µl de solution de travail SYBRGreen I
- ajouter 250 µl de diluant filtré à travers 0,2 µm (eau du milieu filtrée à travers 0,2 µm ou TE à l'occurrence)
- ajouter 5 µl d'échantillon en prévenance d'un écosystème lacustre (2 µl pour des milieux de cultures)
- vortexer et incuber pendant 20 min à l'obscurité et température ambiante
- analyser pendant 1 minute à vitesse moyenne ; paramètres de fluorescence utilisés : E02-500-500-500-500 et FLH1 à 100 minimum

#### X.2.1.5. Comptage de particules **virales** par CMF

- 1 mL d'eau brute ou du filtrat (<2 µm) est prélevé et mis dans un eppendorf de 1,5 mL stérile
- 10 µl de Glutaraldehyde sont ajoutés dans chaque échantillon
- les échantillons sont placés à 4°C et sont analysés le jour même (ou 1 jour après)
- Disposer un nombre égal de tubes que d'échantillons à analyser (plus un blanc) dans un portoir
- ajouter 2,5µl de solution de travail SYBRGreen I
- ajouter 250µl de TE filtré à travers 0.02µm
- ajouter 5µl d'échantillon (2 µl pour des milieux de cultures) et vortexer
- incuber pendant 5 minutes à l'obscurité et température ambiante, puis 15 min à 70°C (au bain marie sur une plaque chauffante) puis re-incuber pendant 5 minutes à température ambiante
- analyser pendant 1 min à vitesse moyenne ; paramètres de fluorescence utilisés : E02-600-500-550-550 et FLH1 à 90

### **X.3. Analyse des fichiers**

Les résultats obtenus sous forme de fichiers informatiques ASCII contenant l'ensemble des informations cytométriques sont analysés au moyen du logiciel CYTOWIN (disponible sur le site <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html#cytowin>). Celui-ci permet de quantifier les groupes et éventuellement de distinguer des sous-groupes (des populations de bactéries différant par exemple par leur taille ou contenu en ADN donc d'activité, de viabilité). La concentration de bactéries (cellules/ml) et de virus (particules/ml) sont ensuite calculée sur un fichier Excel, en tenant compte de la dilution de l'échantillon, du temps d'analyse et de la vitesse d'aspiration du liquide.

### **X.4. Mesure du débit**

Cette mesure est faite très régulièrement afin de connaître le débit précis d'aspiration de l'échantillon et connaître donc le volume analysé au cours du temps d'analyse.

- Mettre de l'eau ultrapure dans un tube CFM et peser (*ex.* : 5,4 g). Mettre le CFM pendant quelques minutes au débit voulu.
- Dévisser l'aiguille d'aspiration mais pas complètement, tirer l'aiguille externe (contre-aiguille) afin qu'elle se détache pour ne pas tenir compte du volume mort. Laisser goutter.
- Revisser l'aiguille interne
- Attendre qu'une goutte tombe et tout de suite simultanément mettre le tube pesé et le balcon et mettre un route le chronomètre
- Faire analyse pendant 10-15 minutes
- Repeser l'échantillon
- Calculer la différence du volume et considérer le temps ; ceci donne le débit

-ANNEXE XI-

PREPARATION DES PRODUITS UTILISEES

**XI.1.** Pour 20 mL de **LYSIS BUFFER** (50mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 0,75 M Sucrose)

- 1 mL of 1M Tris-HCl (ph 8.3)
- 1,6 mL of 0.5 M EDTA (ph 8)
- 5,13 g sucrose
- 17,4 mL H<sub>2</sub>O
- Filtrer à travers 0.2 µm et conserver à -20°C

**XI.2.** Pour 1 L de **0.5 M EDTA (ph 8)** (Ethylenediaminetetraacetic acid (Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O, PM=372)

- 186,1 g EDTA
- Ajouter 800 mL d' H<sub>2</sub>O et mélanger avec un barreau magnétique
- Ajuster le pH à 8 avec 10 M NaOH (~50 mL)
- compléter avec de l'eau à 1L
- Autoclaver
- Conserver à 4°C

**XI.3.** Pour 1 L de **1M Tris-HCl (pH 8,3)** (Tris (Hydroxymethyl) aminomethane. « Crystallized free base” (PM=121.14)

- 121,1 g Tris base
- Ajouter 800 mL d'eau
- Ajuster le pH à 8,3 avec 6N HCl (~37 mL)
- Laisser refroidir à Température ambiante et ajuster le pH une autre fois
- Compléter avec de l'eau à 1 L
- Autoclaver
- Conserver à 4°C

**XI.4.** Pour 300 mL de **10 % SDS** (Sodium Dodecyl Sulfate)

- Peser 30 g SDS sous la hotte
- Mélanger avec un barreau magnétique à 68°C
- Ajuster le pH à 7,2 en ajoutant quelques gouttes de HCl concentré pour un pH=7,2

-Faire des aliquotes et conserver à température ambiante

**XI.5. Pour 50 mL DE ACETATE DE SODIUM 3M**

- 12,31g d'acétate de sodium
- 50 mL d'eau stérile
- autoclaver à 120°C pendant 20 min
- conservation à 4 °C

**XI.6. Préparation de NaOAc 0,01 M (pH 5.2)**

- 1M de NaOAc (0.08 g dans 100 mL d'eau)
- ajouter ca. 1200 µL de HCl 0.1 M

**XI.7. Préparation de BSA (Bovine Serum Albumin)**

Le BSA est utilisé lorsqu'on essaie d'amplifier de l'ADN ancien ou quand on est en présence d'inhibiteurs de PCR.

Le BSA acétylé est utilisé surtout dans les réactions à restriction

Le BSA non acétylé est utilisé surtout en PCR

- Faire une solution stock de 10 mg/mL dans de l'eau stérile
- Filtrer à travers 0,2µm et conservation à -20°C

**XI.8. Préparation du Lysozyme**

Le Lysozyme (muramidase) hydrolyse de façon préférentielle les liaisons entre [[beta]]-1,4 glucosidic N-acetylmuramic acid et N-acetylglucosamine (dans les structures des parois des eubactéries). Une certaine activité mineure est montrée aussi contre les oligomères de chitine.

- Préparer une solution stock de 10 g/L (=1 g in 100mL) dans de l'eau stérile
- Filtrer à travers 0,2µm
- Aliquoter dans des eppendorf de 2 mL
- Conserver à -20°C et utiliser une aliquote à la fois

**XI.9. Préparation de 2 L de tampon TAE 20X (1X TAE : 40mM Tris base, 20mM Na acétate et 1mM EDTA)**

- 190 g Tris-base
- 110 g Na acétate Trihydraté
- 15 g Na<sub>2</sub>EDTA

- Compléter à 1L avec de l'eau ultrapure,
- sous la hotte verticale ajuster le pH à 7,4 avec du HCl concentré (10 N = 37%) : ca. 120 mL
- Compléter à 2 L et conserver à température ambiante
- Contrôler régulièrement son pH, notamment avant de préparer les solutions mères des dénaturants utilisés en DGGE.

**XI.10.** Préparation du tampon **TBE 20X** (1X TBE : 89 mM Tris base, 89 mM acide borique et 2 mM EDTA)

- 216 g Tris base
- 110 g acide borique
- 80 mL EDTA 500mM pH 8
- ajouter ~750 mL d'eau MQ et ajuster le pH à 8.
- Compléter à 1 L avec de l'eau ultrapure et conserver à température ambiante

**XI.11.** Préparation du tampon **1X TE**

- Tris base 0,3 g (10 mM)
- EDTA 0,093g (1 mM)
- Compléter à 250 mL et ajuster le pH à 8.
- Aliquoter et conserver à 4°C

**XI.12.** Préparation des **Amorces**

Quand les amorces sont réceptionnées sous forme lyophilisée :

- Calculer le volume de TE (ou d'eau) qu'il faut ajouter pour avoir une **solution mère de 100 µM** ( $\text{Vol} = (\text{g/PM})/\text{M}$ ) et l'ajouter sous la haute (verser TE dans un becher stérile auparavant ou utiliser des aliquotes de TE stériles et conservés au frigo)
- Mélanger avec la pipette et inverser les tubes
- Mettre à bain marie à 37°C pendant 1h au minimum
- Speed-down
- Préparation de la **solution fille** utilisé en amplification PCR : Diluer 8 fois (concentration finale = 12,5 pmol/µl) avec du TE ou aussi bien avec de l'eau
- congeler



**XI.13. Préparation du mélange de dNTP (2 mM chacun)**

-Mélanger 10 µl de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP, at 100 mM) avec 460 µl d'eau stérile et congeler

**XI.14. Préparation de NaOH 10N**

40 g NaOH pour 100 mL d'eau ultrapure

**XI.15. Préparation de 20 mL de tampon de charge d'électrophorèse « 5X Gel loading buffer » (GBL) (12,5% Ficoll, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,5% SDS, 0,1% Bromophenol Blue and 0,1% Xylene Cyanol)**

-2,5 g Ficoll

-0,5 mL 1M Tris (pH=8)

-0,2 mL 0.5M EDTA

-0.5 mL 20% SDS

-0,25 mL 8% Bromophenol Blue

-0,25 mL 8% Xylene cyanol

-Ajouter 20 mL d'eau stérile. Conserver à température ambiante

**XI.16. Préparation de 10 mL (ou de 20 mL) de 10% (ou 20%) d'APS (Ammonium Persulphate )**

-1 g d'APS dans 10 mL (ou 5mL) d'eau stérile

-Aliquoter à raison de 170 µl et stocker à -20°C (décongeler une seule fois)

**XI.17. Préparation des solution de dénaturation filles 0 et 80%**

- Travailler impérativement avec des gants en nitrile et une blouse
- Essayer de limiter l'espace de travail à une paillasse si possible
- Le travail est effectué sous la hotte !

Les solutions peuvent se conserver environ 3 mois au frigo et entourées par du papier Aluminium.

Préparation du matériel :

-Une solution à 30% (w/v) d'**acrylamide-bisacrylamide** (37.5% Acrylamide : 1% Bisacrylamide) : « SERVA » (*Coger*), conservé au frigo (1 an maximum)

-**TAE 20 X** (conserver à température ambiante de 2 à 3 mois seulement)

-Eau stérile (*Eurobio*)

-de l'urée (*Eurobio*), conservé à T ambiante

-de la **formamide désionisée** (*Eurobio*), conservé à T ambiante

### **Préparation de la solution à 0%**

#### Les ingrédients

-30% acrylamide ( 6% gel): 20 mL

-20X TAE 5mL

-75 mL eau stérile

- Dans une éprouvette ajouter de l'acrylamide, du TAE et l'eau
- Fermer avec du parafilm et mélanger
- Filtrer à travers une unité de filtration de 0,2 µm (Nalgène)
- Mettre la solution dans un flacon et conserver à 4°C et à l'obscurité

### **Préparation de la solution à 80%**

#### Les ingrédients

-30% acrylamide: 20mL

-20X TAE: 5mL

-33,6g urée

-32 mL formamide désionisée

-qsp 100 mL : eau stérile

- Peser l'urée dans l'Erlen
- Ajouter 32 mL de formamide et 10 mL d'eau stérile, 20 mL d'acrylamide et 5 mL de TAE 20X
- dissoudre la solution par agitation de l'Erlen sous de l'eau chaude
- Compléter à 100 mL avec de l'eau stérile
- Filtrer à travers une unité de filtration de 0,2 µm (Nalgène)
- Conserver la solution à 4°C et à l'obscurité

**XI.18.** Préparation du **marqueur de taille et de quantité d'ADN** utilisé en électrophorèse d'agar

"100bp ladder" (*Invitrogen*, 1µg/µl)

- Dilution 10 fois (20 µl et 180 µl de TE)

- Charger 4 µl dans le gel avec bleu de charge

Le fragment plus intense correspond à un fragment de 600 pb de taille

“Low DNA mass ladder ladder” (*Invitrogen*, 1µg/µl)

- 20 µl de Low DNA mass ladder et 30 µl d’eau stérile

Les fragments correspondent à 5-10-20-40-60-100 ng d’ADN de taille respectivement de 100-200-400-800-1200-2000 pb

### **XI.19. Préparation du milieu LB (Luria Broth)**

Le milieu LB est généralement préparé la veille de la manipulation :

- Peser 10 g de bacto-tryptone
- Peser 5 g de Bacton-Yeast Extract
- Peser 5 g de NaCl
- Dissoudre les 3 composants dans 1000 mL d’eau ultrapure
- Ajuster le pH à 7
- Ajouter 5 g d’agar
- Stériliser à l’autoclave 120°C 20min
- Lorsque la température du milieu est environ de 50°C, ajouter l’ampicilline pour obtenir une concentration finale de 100 mg/L
- Répartir le milieu en boîte de Pétri

### **XI.20. Préparation du IPTG**

- 1,2 g IPTG (conservé à –20°C)
- compléter à 50 mL avec de l’eau distillée
- Stériliser en filtrant
- Répartir dans des tubes de 100 µl et conserver à –20°C

### **XI.21. Préparation de X-Gal**

- 100 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside
- Dissoudre dans 2 mL N,N’-dimethyl-formamide
- Couvrir avec une feuille d’aluminium et conserver à –20°C

**XI.22. Préparation du milieu SOC**

- 2 g Bacto-Tryptone
- 0,5 g Bacto-Yeast Extract
- 1 mL 1M NaCl (584,4 mg/10 mL)
- 0,25 mL 1 M KCl (745,5 mg/10 mL)
- 1 mL 2 M Mg<sup>++</sup> stock (1 M MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O (2,03 g/10 mL)/ 1M MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (2,46 g/10 mL)), stérilisé par filtration
- 1 mL 2 M glucose (3,6 g/10 mL), stérilisé par filtration
- mélanger dans 97 mL d'eau stérile le Bacto-Tryptone, le Bacto-Yeast extract, le NaCl et le KCl
- autoclaver à 121 °C pendant 20 min
- laisser refroidir et ajouter le Mg<sup>++</sup> et le glucose
- compléter à 100 mL avec de l'eau stérile, filtrer à travers un filtre de 0,2 µm
- ajouter le pH à 7
- conserver à 4°C



# ARTICLE V





# Biodiversity and aquatic ecosystem functioning: A mini-review

J.-F. Humbert\* and U. Dorigo

INRA, UMR CARRTEL, Equipe Microbiologie Aquatique, BP 511, 74203 Thonon Cedex, France

\*Corresponding author: Tel: +33.4.50.26.78.09; Fax: +33.4.50.26.07.60; E-mail: [humbert@thonon.inra.fr](mailto:humbert@thonon.inra.fr)

5 *Ecosystem functioning depends on multiple interactions among physical, chemical and biological factors. Indeed, ecosystem processes (e.g., productivity and nutrient recycling) result directly from the diversity of functional traits in biotic communities, which in turn are determined by species composition and diversity. Species diversity results both from biotic introductions and from environmental pressures. As a result, changes in biodiversity in response to environmental selection pressures tend to have a direct impact on ecosystem processes. The relationships between biodiversity and ecosystem functioning have been the focus of numerous research studies for several years. Based on these studies, it appears that a low level of biodiversity allows an ecosystem to function effectively under constant conditions, but that greater biodiversity is called for in fluctuating environments. In this paper, we outline the concepts underlying the relationships between biodiversity and ecosystem functioning, and illustrate these concepts with examples from aquatic ecosystems. The importance of spatial scale will also be considered.*

Keywords: spatial scale

## Introduction

20 It has been clearly established that ecosystem functioning depends both on biotic factors and/or processes (such as the diversity and functions of the species, and interactions between species) and abiotic factors (such as climate or geology). However, what relative contribution these two factors make is still a central question in the debate about diversity and ecosystem functioning (Huston and McBride, 2002). This paper will not address this important but very broad question, but will instead focus on what we know about the relationships between biodiversity and ecosystem function.

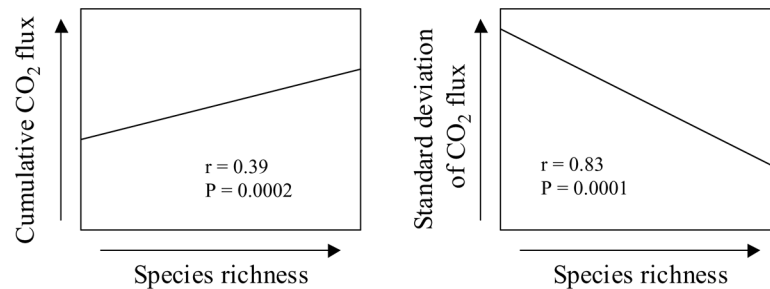
30 For the past fifteen years, an increasing number of studies have focused on biodiversity. This is principally because the world's flora and fauna are disappearing at rates greater than during historical mass extinction events (Chapin et al., 2000). As recently suggested by Thomas et al. (2004), there is an 18 to 35% risk of

species-level extinction resulting from climate changes by the year 2050. Moreover, other processes, for example, agricultural expansion in response to an increasing demand for food, have a negative impact on biodiversity as a result of habitat destruction (Tilman et al., 2001).

40 Most studies of biodiversity have investigated the origin of biodiversity and the main processes involved in the conservation of biodiversity. In the case of aquatic ecosystems, the astonishing species diversity in phytoplankton communities, known as the paradox of phytoplankton diversity (Hutchinson, 1961), has stimulated many studies of the importance of competition for light and/or nutrients, or of the intermediate disturbance hypothesis (e.g., Huysman et al., 1999, 2001; Elliott et al., 2001; Interlandi and Kilham, 2001; Schippers et al., 2001). More globally, an increasing number of papers have also investigated the relationships between biodiversity and ecosystem functioning. This question is of



- 55 interest in theory as well as in application, given the prospect of a global loss of biodiversity on earth over the next fifty years, and in the context of the need for policy decisions about sustainable development.
- 60 The term ‘biodiversity’ has usually been employed with reference to a specific organizational level (species, community . . .), and it is only recently that it has been considered from a functional perspective (Martinez, 1996). Two main types of ecosystem function are generally considered. The first is the productivity of the system in terms of biomass or nutrient fluxes and the second addresses the ‘stability’ of the system. As McCann (2000) points out, definitions of stability can be divided into two categories. The first concerns definitions based on the dynamic stability of a system, whereas the second concerns those based on the ability of a system to withstand change. In this latter category, the concepts of resistance (the degree to which a parameter changes after a disturbance) and resilience (the ability of an ecosystem to return to its equilibrium or non-equilibrium state after a disturbance) are very important. In many cases, the term ‘resistance’ is associated with the ability of a community to resist an invasive species (McCann, 2000).
- 75 In this paper, we review recent findings about relationships between biodiversity and ecosystem functioning. We will first provide the reader with a general outline of the topic, and then illustrate these general and theoretical considerations using several examples from aquatic ecosystems. Thirdly, we will investigate the influence of spatial scale on the relationships between biodiversity and ecosystem functioning. Finally, we will assess likely future challenges.
- 80 In performing this literature review, we carried out keyword searches (e.g., ‘biodiversity’, ‘ecosystem functioning’, ‘keystone species’, ‘insurance hypothesis’, ‘invasive species’) in the major generalist reviews and in reviews on general and microbial ecology. We also searched Current Contents Connect.<sup>®</sup>
- 85 **General aspects of the relationships between biodiversity and ecosystem functioning**
- 95
- 100 In a recent review, Naeem et al. (2002) proposed three hypotheses to account for biodiversity-ecosystem functioning. The first hypothesis is that species are primarily redundant, which means that one species can partially replace another. Many species have the same function, and the loss of one species can therefore be offset by some other species. The second hypothesis is that species are essentially singular, and make unique contributions to ecosystem functioning. The loss or gain of species (generally referred to as Keystone or Key species) therefore has a measurable impact on ecosystem functioning (see Ecology and Society, <http://www.ecologyandsociety.org/collections/keystone.php>). The third hypothesis is that species impacts are context-dependent such that the impact of the loss or gain of a species on ecosystem functioning is idiosyncratic and unpredictable. What happens will depend on the local conditions under which the species extinction or addition occurs. Loreau et al. (2002a) provide a global overview of concepts and debates concerning the relationships between biodiversity and ecosystem functioning.
- 105
- 110
- 115 There are many papers that deal more specifically with the mechanisms involved in the relationships between biodiversity and ecosystem functioning. Many of these studies investigated the niche complementarity mechanism, stimulating both theoretical and experimental approaches (e.g., Naeem et al., 1994; Loreau, 1998). The sampling effect, difficult to distinguish from the niche complementarity, is defined as the greater likelihood of finding species with a strong impact on ecosystem functioning in highly diversified communities (e.g., Huston, 1997; Hector et al., 1999; Wardle, 1999). These are not either-or mechanisms, but may be viewed as concomitant processes (Naeem, 2002). Sampling effects are involved in community assembly, and thus in determining the number of phenotypic traits present in the community. Subsequently, this phenotypic diversity influences ecosystem processes through mechanisms that can be viewed as a continuum ranging from the selection of species with particular traits to complementarity among species with different traits (Loreau et al., 2001).
- 120
- 125
- 130 Mathematical modelling has been used recently to investigate the relationships between biodiversity and ecosystem stability. For example, McCann et al. (1998) have shown that weak to intermediate interaction strengths within food webs are important in promoting community persistence and stability. These authors made four predictions. The first is that if the food web includes some relatively weak interactions then it is likely to be stabilized with regard to oscillatory subsystems. The second is that chaotic dynamics are unlikely in food webs characterized by numerous weak interactions. The third is that the dynamics of generalist-dominated food webs can be expected to be less variable than those dominated by specialists. Finally, the fourth prediction is that severely diminished food webs will tend to oscillate more than reticulate food webs.
- 135
- 140
- 145
- 150
- 155



**Figure 1.** Relationships between diversity and ecosystem respiration in the experiments of McGrady-Steed et al. (1997).

Indeed, in this case, depauperate food web species tend to have above-average interaction strengths, which promote the dominance of a few strong oscillatory interactions. This means that decreasing biodiversity will be accompanied by an increase in the average strengths of the interactions within ecosystems, and a concomitant decrease in ecosystem stability.

Another interesting theoretical analysis of the relationships between biodiversity and ecosystem stability is the formalization by a stochastic model (Yachi and Loreau, 1999) of the insurance hypothesis which is based on two ideas. The first is that increasing diversity increases the odds that at least some species will respond differently to variable conditions and perturbations. The second is that greater diversity increases the odds that an ecosystem will display functional redundancy by containing species that are capable of functionally replacing important species.

Finally, the link between biodiversity and the ability of the ecosystem to resist an invasive species is well documented. Using mathematical modeling, Case (1990) showed that diversified communities are more resistant to invasive species than non-diversified ones. This has been confirmed by experimental studies, such as those of McGrady-Steed et al. (1997) and Kennedy et al. (2002).

## Examples of relationships between biodiversity and aquatic ecosystems functioning

First at all, as pointed out by Giller et al. (2004) and Gessner et al. (2004), there seem to have been fewer studies investigating this relationship within aquatic ecosystems than in terrestrial ones.

The first study of this type was that of McGrady-Steed et al. (1997) which was based on experiments in aquatic microcosms. Ecosystem respiration (estimated from the CO<sub>2</sub> production) and resistance to an

invasive species was evaluated for numerous combinations of species characterized by different trophic positions (producers, herbivores, bacterivores and predators). These experiments yielded two main findings. Firstly, when species richness increased there was a global increase in CO<sub>2</sub> production and a decrease among replicates in the standard deviations of CO<sub>2</sub> production (Figure 1). This means that predictability of ecosystem performance was greater in communities characterized by high species richness. Secondly, it was found that most of the communities with low biodiversity had been successfully invaded, but also that biodiversity had non-linear effects on the resistance to invasion, which means that some different species must have redundant functions in the system. In answer to criticism of the analytical method used in this study, Morin and McGrady (2004) re-evaluated the data set using a new analytical method based on resampling statistics and confirmed the negative relationship between richness and the variability of carbon dioxide flux.

Emmerson et al. (2001) established 241 mesocosms containing different experimental or natural combinations of species and biomass levels in Sweden, Scotland and South Australia. They found that ecosystem responses became more predictable when species richness increased. Nevertheless, at the global scale it was demonstrated that species richness and functional group richness had no consistent effect on ecosystem function at these sites. At the regional level, there was stronger evidence that diversity had positive effects on ecosystem functioning in naturally assembled communities. Both sampling effects and complementary-niche mechanisms have been invoked to explain this positive relationship.

Cardinale et al. (2002), in a study of the importance of interspecies facilitation processes on ecosystem functions, investigated three species of *Trichopteres* that occur together in the eastern United States. Resource consumption by individual larvae was compared

- in experimental stream mesocosms, and found to be related to differences in near-bed velocity and bed roughness. These experiments were performed both in streams containing a single species and in streams containing mixed assemblages. The findings showed that most of the increase in particulate matter consumption of diverse assemblages was due to species complementarity rather than to sampling effects. This was explained by differences between these assemblages with regard to the near-bed velocity, which enhances the feeding success of individuals. These differences were generated by the greater topographical complexity in mixed assemblages. Hence, this study showed that increasing the species diversity of a group of aquatic arthropods leads to positive interactions that potentially enhance ecosystem functioning.
- In an experimental study investigating the relationship between cladoceran species richness and ecosystem functioning, Norberg (2000) found that complementarity in prey-size use between two predator species, *Daphnia magna* and *Chydorus sphaericus*, affects the composition of the prey community (large, grazing-resistant species are preferentially selected), and consequently the productivity of this prey community. The importance of interactions between microorganisms for biodiversity effects was highlighted in the study of Naeem et al. (2000). By manipulating simultaneously producer (green algal) and decomposer (heterotrophic bacterial) biodiversity in freshwater microcosms, the authors observed that the variations in algal production in these microcosms were not explained by either algal or bacterial diversity alone. The co-dependency between algae and bacteria for carbon use strongly influenced the response of the ecosystem to changes in biodiversity.
- The importance of interactions between species has also been demonstrated by Carr et al. (2002), who found that complex interactions among multiple coral-reef fish species are necessary for the stability of these fish communities at both the local and regional scales. Some species can also play a key role in ecosystem functioning, as illustrated by Bellwood et al. (2003). These authors showed that the over-fishing of just one out of the 3000 species of fish present, the giant hump-head parrotfish, can disturb the functional well-being of the entire coral reef ecosystems.
- With respect to the relationship between food-web complexity and stability, Petchey (2000) supported the MacArthur hypothesis (MacArthur, 1955) by showing that increased food-web complexity increased the stability of the ecosystem. Using an experimental approach in microcosms, he found that both prey species composition and prey diversity affect predator population stability. This positive relationship was principally explained by prey reliability mechanisms. In the same way, on the basis of another mesocosm experiment, and on the development of a model of intermediate complexity in which trophic levels were separated into functional groups, Hulot et al. (2000) demonstrated the importance of functional diversity within trophic levels and indirect interactions in the response of ecosystems to perturbations.
- It has been suggested that the relationships between the biodiversity and productivity of ecosystems may depend on the history of the community assembly. Using a freshwater microbial community, Fukami and Morin (2003) found that the productivity-diversity relationships in the different assemblages of species took different forms (U-shaped, hump-shaped. . .) after 30 generations, and that the history of the communities contributed significantly to these differences.
- The importance of spatial scale in relationships between biodiversity and ecosystem functioning**
- Most research into the relationships between biodiversity and ecosystem functioning has been carried out at a small spatial scale, such as the microcosm or mesocosm, but also over a short time scale (a few generations) (Bengtsson et al., 2002; Naeem and Wright, 2003). Happily, there are also some studies that have been done in natural environments and which involve different spatial scales. In a review by Waide et al. (1999), unimodal patterns were found to be dominant when studying cross communities, while at geographical scales of more than 20 km, such as at landscape or regional scales, a larger proportion of positive patterns occurs for plants. At a very large scale (continent), species richness seems to be primarily a positive outcome of productivity.
- More recently, in a meta-analysis of 171 published papers, Mittelbach et al. (2001) confirmed that there are no general patterns, and that patterns are scale- and taxon-dependent. For example, a hump-shaped relationship was usually found for vascular plants at geographical scales smaller than continents, whereas a positive productivity-diversity relationship became more common at large spatial scales. For animals, hump-shaped and also both positive and negative patterns were common at most geographical scales, and no single pattern predominated. A debate on this paper between Whittaker and Heegaard (2003) and Mittelbach

335 et al. (2003) highlighted the difficulty of performing  
such a meta-analysis, due to the variable quality and  
analysis of the data sets, but also the need to allow for  
the spatial scale.

340 In their study of 33 lakes, Dodson et al. (2000)  
found that for both phytoplankton and fish the richness-  
productivity relationship was highly dependent on the  
area of the lake. In the case of phytoplankton, the shape  
of the relationship between species richness and pelagic  
primary productivity shifts from a hump-shaped curve  
(in small lakes) to a U-shaped curve (in large lakes).  
345 In contrast, the opposite trend was found for fish.

350 The relationship between primary productivity and  
species diversity was compared in ponds at two differ-  
ent spatial scales by Chase and Leibold (2003). They  
looked at the local scale of an individual pond and at  
the regional scale of a watershed. At the local scale, a  
hump-shaped relationship was found between primary  
productivity and both producer and animal species rich-  
ness (Figure 2). On the other hand, there was a linear  
relationship between species richness and productiv-  
ity at the regional scale. This clearly demonstrated that  
355 for this study model, the shape of the productivity-  
diversity relationship depended on the spatial scale un-  
der consideration. It was also found that species dissim-  
ilarity between ponds increased with the productivity  
of the ponds, which accounts for the scale-dependent  
productivity-diversity relationship.

360 A number of papers deal with the relationships  
between local and regional diversity. For example,  
Witman et al. (2004) clearly show that biodiversity  
in local marine benthic communities is strongly influ-  
enced by the diversity of the regional species pool.  
365 On a more global scale, they also show that the ex-  
tent of the regional influence on local biodiversity de-  
pends on latitude. In their review paper, Bengtsson et  
al. (2002) have suggested that diversity has its main  
370

impact on the rates of ecosystem processes at a local  
scale, whereas, at a regional scale, the main impact of  
diversity is on resilience and stability-related functions.  
In a theoretical approach, Norberg et al. (2001) showed  
375 that long-term productivity may be greater for a system  
that can adapt, and that external inputs make it possi-  
ble to sustain phenotype variance. Thus, in changing  
environments, ecosystem functioning at the local scale  
will depend on the surrounding area. In the same way,  
Loreau et al. (2003) demonstrated that species diversity  
380 maintained by dispersal among ecosystems provides a  
spatial insurance for ecosystem functioning in hetero-  
geneous landscapes.

385 The consequences of all these findings are very im-  
portant for the conservation and management of nature  
reserves (Bengtsson et al., 2003; Loreau et al., 2003;  
Witman et al., 2004). In a fragmented context, the ex-  
tent to which the different areas are connected may  
have an effect on species diversity, and consequently  
on ecosystem functioning from local to regional scales.  
390

## Future challenges

395 Studies and publications about the relationships be-  
tween biodiversity and ecosystem functioning have  
contributed to significant advances in our knowledge  
of this subject during the last ten years and provide  
a good overview of the challenges likely to face us in the  
future.

400 Most of these studies indicate that there is a pos-  
itive relationship between biodiversity and ecosystem  
processes at a local scale, whereas at a larger scale  
(landscape to regional), biodiversity seems principally  
to affect the resistance and stability-related functions  
of ecosystems (Bengtsson et al., 2002). Nevertheless,  
the debate about the role of biodiversity in ecosystem  
functioning is still open, and will doubtless generate

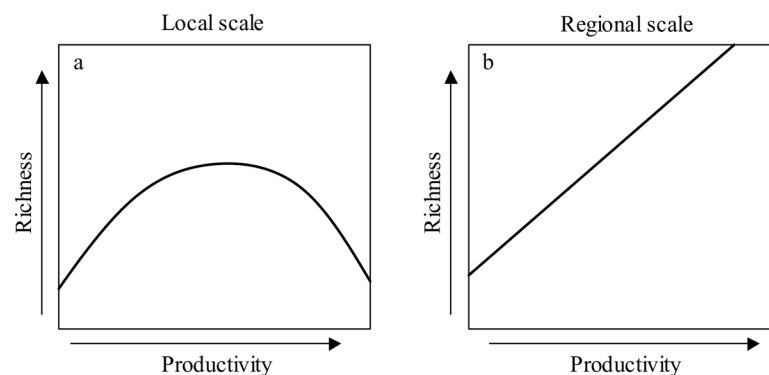


Figure 2. Shapes of the diversity-productivity relationships observed at two different spatial scales by Chase and Leibold (2003).

405 much stimulating discussion and research in the years  
to come. Most of this will probably concern the various  
hypotheses of biodiversity and ecosystem functioning,  
but also the scaling effects of biodiversity on ecosystem  
410 functioning, and finally the complexity of the statistical  
analysis of current biodiversity-functioning studies.

One of the challenges identified as being likely in  
coming years is the absolute necessity to elucidate the  
mechanisms that explain the patterns observed in re-  
lationships between biodiversity and ecosystem func-  
415 tioning. In small-scale experiments, two main classes of  
mechanism (niche differentiation and facilitation, and  
sampling effect) seem to be involved in the relation-  
ships between biodiversity and ecosystem functioning,  
but there is less information about the functional ef-  
420 fects of biodiversity changes on an entire ecosystem.  
No mechanisms have yet been identified that can ex-  
plain why species diversity enhances invasion resis-  
tance, as Levine et al. (2002) have pointed out.

With this goal in mind, new experiments based on  
multivariate approaches and including different trophic  
levels, must be performed at different spatial and eco-  
logical scales (Loreau et al., 2001; Loreau et al., 2002b).  
Hulot et al. (2000) have shown, for example, that an  
430 approach based on functional groups leads to a better  
understanding of ecosystem functioning than the con-  
ventional linear food-chain approach. In the same way,  
a very interesting analysis of the relationships between  
functional and species diversity has been provided by  
Hooper et al. (2002).

435 In the case of aquatic ecosystems, we think that  
there will be many studies of microbial diversity in  
the next few years intended to provide a better as-  
sessment of the impact of microbial interactions on  
how the whole ecosystem functions. Indeed, in a ter-  
440 restrial study model, van der Heidjen et al. (1998)  
showed that mycorrhizal fungal diversity determines  
both plant diversity and ecosystem productivity. In  
aquatic ecosystems, evaluation of the microbial diver-  
sity is still severely restricted by the absence of suit-  
445 able techniques required to do this work. The recent  
development of molecular techniques will help to over-  
come these restrictions. For example, the diversity of  
some natural viral communities has now been assessed  
in aquatic ecosystems (e.g., Wommack et al., 1999;  
450 Zhong et al., 2002; Dorigo et al., 2004). Assessing the  
dynamics and diversity of aquatic virioplankton will  
be crucial, because of the important role they have in  
controlling diversity and dynamics of aquatic microbial  
communities (Wommack and Colwell, 2000).

455 These molecular techniques now make it possible  
to understand the contributions of different taxonomic

groups within a community to the relationship be-  
tween productivity and biodiversity. By way of illustra-  
tion, Horner-Devine et al. (2003) found that different  
groups of bacteria ( $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria  
460 and Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides) exhibited  
different responses (U-shaped, no relationship, hump-  
shaped, respectively) to changes in primary productiv-  
ity, and no clear trend could be detected for the overall  
bacterial richness. Some very promising developments  
465 may now make it possible, for instance, to elucidate  
the functional significance of these contrasting curve  
shapes.

## Acknowledgements

470 We are grateful to Stéphan Jacquet and the two  
anonymous reviewers for critical review of this  
manuscript. The English text has been checked by  
Monika Ghosh.

## References

- Bellwood, D. R., Hoey, A. S., Choat, J. H., 2003. Limited functional  
475 redundancy in high diversity systems: resilience and ecosystem  
function on coral reefs. *Ecol. Lett.* 6, 281–285.
- Bengtsson, J., Engelhardt, K., Giller, P., Hobbie, S., Lawrence, D.,  
Levine, J., Vilà, M., Wolters, V., 2002. Slippin' and slidin'  
480 between the scales: the scaling components of biodiversity-  
ecosystem functioning relations. In: M. Loreau, S. Naeem, P. In-  
chausti (Eds), *Biodiversity and Ecosystem Functioning - Synthe-  
sis and Perspectives*, pp. 209–220. Oxford University Press Inc.,  
New York.
- Bengtsson, J., Angelstam, P., Elmqvist, T., Emanuelsson, U.,  
485 Folke, C., Ihse, M., Moberg, F., Nyström, M., 2003. Reserves,  
resilience and dynamic landscapes. *Ambio* 32, 389–396.
- Cardinale, B. J., Palmer, M. A., Collins, S. L., 2002. Species diver-  
sity enhances ecosystem functioning through interspecific facil-  
490 itation. *Nature* 415, 426–429.
- Carr, M. H., Anderson, T. W., Hixon, M. A., 2002. Biodiversity, popu-  
lation regulation, and the stability of coral-reef fish communities.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99, 11241–11245.
- Case, T. J., 1990. Invasion resistance arises in strongly interacting  
495 species-rich model competition communities. *Proc. Nat. Acad.  
Sci. USA* 87, 9610–9614.
- Chapin III, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek,  
P. M., Reynolds, H. L., Hooper, D. U., Lavorel, S., Sala, O. E.,  
Hobbie, S. E., Mack, M. C., Diaz, S., 2001. Consequences of  
500 changing biodiversity. *Nature* 405, 234–242.
- Chase, J. M., Leibold, M. A., 2003. Spatial scale dictates the  
productivity-biodiversity relationship. *Nature* 416, 427–430.
- Dodson, S. I., Arnott, S. E., Cottingham, K. L., 2000. The relationship  
in lake communities between primary productivity and species  
505 richness. *Ecology* 81, 2662–2679.
- Dorigo, U., Jacquet, S., Humbert, J.-F., 2004. Cyanophage diversity  
inferred from g20 gene analysis in the largest natural French  
lakes, Lake Bourget (France). *Appl. Environ. Microb.* 70, 1017–  
1022.

- 510 Elliott, J. A., Irish, A. E., Reynolds, C. S., 2001. The effects of vertical mixing on a phytoplankton community: a modelling approach to the intermediate disturbance hypothesis. *Fresh. Biol.* 46, 1291–1297.
- Emmerson, M. C., Solan, M., Emes, C., Paterson, D. M., Raffaelli, D., 2001. Consistent patterns and the idiosyncratic effects of biodiversity in marine ecosystems. *Nature* 411, 73–77.
- 515 Fukami, T., Morin, P. J., 2003. Productivity-biodiversity relationships depend on the history of community assembly. *Nature* 424, 423–426.
- 520 Gessner, M. O., Inchausti, P., Persson, L., Raffaelli, D. G., Giller, P. S., 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: insights from aquatic systems. *Oikos* 104, 419–422.
- Giller, P. S., Hillebrand, H., Berninger, U. G., Gessner, M. O., Hawkins, S., Inchausti, P., Inglis, C., Leslie, H., Malmqvist, B., Monaghan, M. T., Morin, P. J., O'Mullan, G., 2004. Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *Oikos* 104, 423–426.
- 525 Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M. C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P. G., Finn, J. A., Freitas, H., Giller, P. S., Good, J., Harris, R., Höglberg, P., Huss-Danell, K., Joshi, J., Jumpponen, A., Körner, C., Leadley, P. W., Loreau, M., Minns, A., Mulder, C. P. H., O'Donovan, G., Otway, S. J., Pereira, J. S., Prinz, A., Read, D. J., Scherer-Lorenzen, M., Schulze, E.-D., Siamantziouras, A.-S. D., Spehn, E. M., Terry, A. C., Troumbis, A. Y., Woodward, F. Y., Yachi, S., Lawton, J. H., 1999. Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* 286, 1123–1127.
- 530 Hooper, D. U., Solan, M., Symstad, A., Diaz, S., Gessner, M. O., Buchmann, N., Degrange, V., Grime, P., Hulot, F., Mermillod-Blondin, F., Roy, J., Spehn, E., van Peer, L., 2002. Species diversity, functional diversity, and ecosystem functioning. In: M. Loreau, S. Naeem, P. Inchausti (Eds), *Biodiversity and Ecosystem Functioning - Synthesis and Perspectives*, pp. 195–208. Oxford University Press Inc., New York.
- 535 Horner-Devine, M. C., Leibold, M. A., Smith, V. H., Bohannan, J. M., 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol. Lett.* 6, 613–622.
- Hulot, F. D., Lacroix, G., Lescher-Moutoué, F., Loreau, M., 2000. Functional diversity governs ecosystem response to nutrient enrichment. *Nature* 405, 340–344.
- 540 Huston, M. A., 1997. Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. *Oecologia* 110, 449–460.
- Huston, M. A., McBride, A. C., 2002. Evaluating the relative strengths of biotic versus abiotic controls on ecosystem processes. In: M. Loreau, S. Naeem, P. Inchausti (Eds), *Biodiversity and Ecosystem Functioning - Synthesis and Perspectives*, pp. 47–60. Oxford University Press Inc., New York.
- 545 Hutchinson, G. E., 1961. The paradox of the plankton. *Am. Nat.* 95, 137–145.
- 550 Huysman, J., Jonker, R. R., Zonneveld, C., Weissing, F. J., 1999. Competition for light between phytoplankton species: experimental tests of mechanistic theory. *Ecology* 80, 211–222.
- Huysman, J., Johansson, A. M., Folmer, E. O., Weissing, F. J., 2001. Towards a solution of the plankton paradox: the importance of physiology and life history. *Ecol. Lett.* 4, 408–411.
- 555 Interlandi, S. J., Kilham, S. S., 2001. Limiting resources and the regulation of diversity in phytoplankton communities. *Ecology* 82, 1270–1282.
- Kennedy, T. A., Naeem, S., Howe, K. M., Knops, J. M. H., Tilman, D., Reich, P., 2002. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* 417, 636–638.
- 560 Levine, J. M., Kennedy, T., Naeem, S., 2002. Neighbourhood scale effects of species diversity on biological invasions and their relationship to community patterns. In: M. Loreau, S. Naeem, P. Inchausti (Eds), *Biodiversity and Ecosystem Functioning - Synthesis and Perspectives*, pp. 114–124. Oxford University Press Inc., New York.
- 565 Loreau, M., 1998. Biodiversity and ecosystem functioning: a mechanistic model. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 5632–5636.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., Huston, M. A., Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D. A., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges. *Science* 294, 804–808.
- 570 Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P. (Eds), 2002a. *Biodiversity and Ecosystem Functioning-Synthesis and Perspectives*. Oxford University Press, New York, NY.
- 575 Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., 2002b. Perspectives and challenges. In: M. Loreau, S. Naeem, P. Inchausti (Eds), *Biodiversity and Ecosystem Functioning - Synthesis and Perspectives*, pp. 237–242. Oxford University Press Inc., New York.
- Loreau, M., Mouquet, N., Gonzalez, A., 2003. Biodiversity as spatial insurance in heterogeneous landscapes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100, 13765–12770.
- 580 Martinez, N. D., 1996. Defining and measuring functional aspects of biodiversity. In: K. J. Gaston (Ed), *Biodiversity - A Biology of Numbers and Differences*, pp. 114–118. Blackwell Science, Oxford.
- 585 MacArthur, R., 1955. Fluctuations of animal populations and a measure of community stability. *Ecology* 36, 533–536.
- 590 McCann, K. S., 2000. The diversity - stability debate. *Nature* 405, 228–233.
- 595 McCann, K. S., Hastings, A., Huxel, G. R., 1998. Weak trophic interactions and the balance of nature. *Nature* 395, 794–798.
- 600 McGrady-Steed, J., Harris, P. M., Morin, P. J., 1997. Biodiversity regulates ecosystem predictability. *Nature* 390, 162–165.
- 605 Mittelbach, G. G., Steiner, C. F., Scheiner, S. M., Gross, K. L., Reynolds, H. L., Waide, R. B., Willig, M. R., Dodson, S. I., Gough, L., 2001. What is the observed relationship between species richness and productivity? *Ecology* 82, 2381–2396.
- 610 Mittelbach, G. G., Scheiner, S. M., Steiner, C. F., 2003. What is the observed relationship between species richness and productivity? Reply. *Ecology* 84, 3390–3395.
- 615 Morin, P. J., McGrady-Steed, J., 2004. Biodiversity and ecosystem functioning in aquatic microbial systems: a new analysis of temporal variation and species richness-predictability relations. *Oikos* 104, 458–466.
- 620 Naeem, J., Wright, J. P., 2003. Disentangling biodiversity effects on ecosystem functioning: deriving solutions to a seemingly insurmountable problem. *Ecol. Lett.* 6, 567–579.
- Naeem, S., 2002. Ecosystem consequences of biodiversity loss: the evolution of a paradigm. *Ecology* 83, 1537–1552.
- 625 Naeem, S., Hahn, D. R., Schuurman, G., 2000. Producer-decomposer co-dependency influences biodiversity effects. *Nature* 403, 762–764.
- Naeem, S., Loreau, M., Inchausti, P., 2002. Biodiversity and ecosystem functioning: the emergence of a synthetic ecological framework. In: M. Loreau, S. Naeem, P. Inchausti (Eds), *Biodiversity*

- 630 *and Ecosystem Functioning - Synthesis and Perspectives*, pp. 3–11. Oxford University Press Inc., New York.
- Naeem, S., Thompson, L. J., Lawler, S. P., Lawton, J. H., Woodfin, R. M., 1994. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature* 368, 734–737.
- 635 Norberg, J., 2000. Resource-niche complementarity and autotrophic compensation determines ecosystem-level responses to increased cladoceran species richness. *Oecologia* 122, 264–272.
- Norberg, J., Swaney, D. P., Dushoff, J., Lin, J., Casagrandi, R., Levin, S. A., 2001. Phenotypic diversity and ecosystem functioning in changing environments: a theoretical framework. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 11376–11381.
- 640 Petchev, O. L., 2000. Prey diversity, prey composition, and predator population dynamics in experimental microcosms. *J. Anim. Ecol.* 69, 874–882.
- 645 Schippers, P., Verschoor, A. M., Vos, M., Mooij, W. M., 2001. Does “supersaturated coexistence resolve the paradox of the plankton”? *Ecol. Lett.* 4, 404–407.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., Ferreira de Siqueira, M., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Peterson, A. T., Phillips, O. L., Williams, S. E., 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145–148.
- 650 Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D’Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W. H., Simberloff, D., Swackhamer, D., 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292, 281–284.
- 655 van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I. R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72.
- 660 Waide, R. B., Willig, M. R., Steiner, C. F., Mittelbach, G., Gough, L., Dodson, S. I., Juday, G. P., Parmenter, R., 1999. The relationship between productivity and species richness. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30, 257–300.
- 665 Wardle, D. A., 1999. Is “sampling effect” a problem for experiments investigating biodiversity- ecosystem function relationships. *Oikos* 89, 11–23.
- Whittaker, R. J., Heegaard, E., 2003. What is the observed relationship between species richness and productivity? *Comment. Ecology* 84, 3384–3390.
- 670 Witman, J. D., Etter, R. J., Smith, F., 2004. The relationship between regional and local species diversity in marine benthic communities: a global perspective. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101, 15664–15669.
- 675 Wommack, K. E., Colwell, R. R., 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 69–114.
- Wommack, K. E., Ravel, J., Hill, R. T., Chun, J., Colwell, R. R., 1999. Population dynamics of Chesapeake Bay Virioplankton: total-community analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 231–240.
- 680 Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 1463–1468.
- 685 Zhong, Y., Chen, F., Wilhelm, S. W., Poorvin, L., Hodson, R. E., 2002. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene g20. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1576–1584.

# ARTICLE VI





## **Necessary tests for accurate counting of freshwater microbial communities using either flow cytometry or epifluorescence microscopy**

Ursula Dorigo, Sébastien Personnic, Stéphan Jacquet\*

UMR CARRTEL (INRA /Université de Savoie), Equipe de Microbiologie Aquatique, BP 511,  
74203 Thonon cedex, France

**Running title:** Accurate counting of freshwater bacterio- and virioplankton

\* Corresponding author. Tel.: 33.4.50.26.78.12; Fax: 33.4.50.26.07.60.

E-mail address: jacquet@thonon.inra.fr

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

### **Abstract**

Concerns about obtaining accurate determinations of the concentrations of viruses and bacteria in freshwater samples led us to examine a broad battery of counting and storage procedures for use in flow cytometry (FCM) and epifluorescence microscopy (EFM) analyses. Sample preparations were done so as to optimize counts and preservation by using different types and concentrations of aldehyde-based fixatives, stains belonging to the SYBR family, dilution media, temperature and storage conditions. Whenever possible, FCM and EFM counts were compared. Results obtained using FCM supported the addition of fixative for bacteria, preferably glutaraldehyde at a final concentration of 2%, dilution in 0.2- $\mu$ m or

0.02- $\mu\text{m}$  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- $\mu\text{m}$  filtered TE and incubation with SYBR Gold at a final concentration of  $2 \times 10^{-5}$  at  $75^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes is recommended. If possible, FCM samples should be counted on day = 0, although we do show that bacterioplankton samples, at least, may be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  and counted at 24 h later but not beyond. The conditions required for optimum EFM counts of both bacteria and viruses involved were to 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Our results performed on sub-alpine lakes clearly demonstrate the importance of defining the best conditions in order to get reliable counts of microbial communities such as viruses and bacteria. Each research laboratory should undertake such tests according to the equipment available, and the needs and area of their research.

## 1. Introduction

Bacteria and viruses have been shown to be key 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 and 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 are important in the control of plankton community composition, diversity and succession, and play a key role in bacterioplankton cell mortality (Wommack and Colwell, 2000; Sime-Ngando et al., 2003; Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004) with impacts that vary according to the ecosystem, time and space. They are responsible for 10-60% of the daily bacterioplankton mortality (Simek et al., 2001; Fischer and Velimirov, 2002; Bettarel et al., 2003; Bettarel et al., 2004), and are the most abundant biological particles in both the marine and freshwater environments, with typically  $10^7$ - $10^9$  viruses.mL<sup>-1</sup> (Wommack and Colwell, 2000). Bacterioplankton densities typically range from  $10^5$  to  $10^7$  cells.mL<sup>-1</sup> (Bettarel et al., 2003). These densities 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

to elucidate their role in aquatic systems, we need accurate and rapid determinations of their abundances, and to use intense sampling 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). First estimates of viral numbers were obtained using TEM after ultrafiltration (Proctor and Fuhrman, 1990; Paul et al., 1991) or ultracentrifugation (Bergh et al., 1989; Børsheim et al., 1990; Bratbak and Heldal, 1993; Sime-Ngando, 1997; Bergström and 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 and 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 and Fuhrman, 1998; Marie et al., 1999a; Shopov et al., 2000; Chen et al., 2001; Middelboe and Glud, 2003; Wen et al., 2004). FCM can be used to perform very accurate and fast counts (Brussard et al., 2000; Vives-Rego et al., 2000; Li and 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 and Hughes, 1992; Troussellier et al., 1995; Lebaron et al., 1998a) marine viruses in cultures (Marie et al., 1999a; Brussard, 2004); but 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 and 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 Brussard (2004). Similar work has also been done for EFM (Brussard, 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 and Suttle, 1995; Bettarel et al., 2000; Noble, 2001); but very few studies have attempted to compare the effectiveness of all three techniques (TEM, EFM, 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 preconcentration 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 non-photoautotrophic (commonly known as heterotrophic) bacterial communities 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.

## 2. Materials and 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 and from the oligotrophic Lake Annecy (Domaizon et al., 2003). Lake water was immediately transported 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 (see below). Experiment 8 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. To avoid contamination, fixatives and dilution solutions, adjusted to a final pH of 7.5 were filtered through 0.2 µm (for bacterial analyses) or 0.02 µm (for viral analyses) using syringe filter (Millipore). Fixation was performed for at least 15 min at ambient temperature (*i.e.* ~20°C), and each sample was vortexed and then diluted 50 fold in the dilution solution. Incubation with the dye occurred at dim light at 20, 45, 65 or 75°C (see later). Details of the buffered dilution solutions, stains and fixatives are provided in Tab. 1.

**Tab.1.** Details of the dilution solutions, dyes and fixatives used in our study

| Name and concentration used | Chemical composition   | Classification                                     | Characteristics and use   |
|-----------------------------|--|--|---|
| TE (1X)                     | 10 mM Tris, 1 mM EDTA <sup>e</sup>   | Buffer   | Elution and storage of DNA/RNA  |
| TAE (1X)                    | 40 mM Tris acetate, 20 mM sodium acetate, 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA <sup>e</sup>  | Buffer   | Used in electrophoresis; better resolution of supercoiled DNAs than TBE (14)  |
| TBE (1X)                    | 89 mM Tris-base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA <sup>e</sup>  | Buffer   | Used in electrophoresis; more stable and higher buffering capacity than TAE (42)  |
| 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 <sup>a</sup>   | Composition unknown (y)<br>Provided as 10,000X concentrate in DMSO   | Fluorescence dye (intercalating type) (36, 35, 40) | 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 <sup>b</sup>  | Composition unknown (y), provided as 10,000X concentrate in DMSO   | <b>Fluorescence dye (intercalating type)</b> (30)  | 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 <sup>c</sup>      | Composition unknown (y), provided as 10,000X concentrate in DMSO   | Fluorescence dye (intercalating type) (13, 40)     | 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 <sub>2</sub> O)<br>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 (52, 59) |
| GA (Glutaraldehyde)         | Aldehyde (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> ),   | Fixative   | Cells keeps osmotic properties, reacts only slightly with lipids  |
| PF (Paraformaldehyde)       | Aldehyde (PBS and paraformaldehyde, pH 7.4)<br>Polymers of methylene hydrate = the polymerized form of FA which lacks cross-linking properties | Fixative   | Higher cell fluorescence than GA (52, 59)   |

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

*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, (Marie et al., 1999b), diluted in each dilution solution and finally stained with either SYBR Green I and II (Molecular Probes) for 15 min at room temperature 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 FCM analyses. From experiment 1 we retained those 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, a set of 1 mL duplicate subsample was kept at 4°C and was then analyzed on days 0, 1, 8 and 30, and 3 sets of 1 mL duplicate subsamples were left for 15 min at 4°C before being stored at -20°C. In this way each frozen sample was thawed only once just before being analyzed at t = 1, 8 or 30 days. Previous results suggested that repeated thawing clearly has a negative impact on the total counts, and we obviously wanted to avoid this (data not shown). At t<sub>0</sub>, the samples were diluted as seen above. At t<sub>1</sub>, 8 and 30 days, refrigerated samples, particularly those stored at -20°C, were warmed to room temperature over 15 min (previous experiments had shown that cold samples had a negative effect on the quality of the FCM signature), vortexed and diluted. The diluted samples were then stained for 15 min at room temperature with the nucleic acid dye SYBR Green I a final concentration of 10<sup>-4</sup> (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<sup>-4</sup>, 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  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ) for counting bacteria and viruses by FCM. 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  $20^{\circ}\text{C}$  for bacteria, or after incubating at  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$  or  $75^{\circ}\text{C}$  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  $75^{\circ}\text{C}$  (35).

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  $4^{\circ}\text{C}$ . 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  $20^{\circ}\text{C}$  (15 min),  $45^{\circ}\text{C}$  and  $75^{\circ}\text{C}$ , the latter two lasting for 10 min, followed by cooling for 5 min at room temperature.

Experiment 7. 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), TE was autoclaved or not, filtered through a 0.02- $\mu\text{m}$  or 0.2- $\mu\text{m}$  filter. The 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  $75^{\circ}\text{C}$ , and FCM analyses were done.

Experiment 8. 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- $\mu\text{m}$  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 (41) 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  $\mu\text{l}$  of an antifading solution was added, that had been prepared as recommended by Noble (Noble and Fuhrman, 1998) apart from containing less p-phenylenediamine. Briefly, we prepared a solution of 990  $\mu\text{l}$  of a 50% PBS + 50% glycerol mixture with 10  $\mu\text{L}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  for no more than a couple of days. In addition to the viral and bacterial counts at  $t = 0$ , 10 of the 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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 was analyzed for bacteria and viruses in order to compare the counts obtained by FCM and EFM. For the FCM analyses, samples were fixed in 0.25% 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  $75^{\circ}\text{C}$  and then cooled for 5 min prior to analysis. 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  $-20^{\circ}\text{C}$  for up to a few days.

Flow cytometry analyses. We used a FACSCalibur (Becton Dickinson, BD) 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 virioplankton. MilliQ water was used as a sheath fluid since no significant differences were recorded between filtered lake water or the 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 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- $\mu\text{m}$  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:  $530\pm 15$  nm) and the red fluorescence of

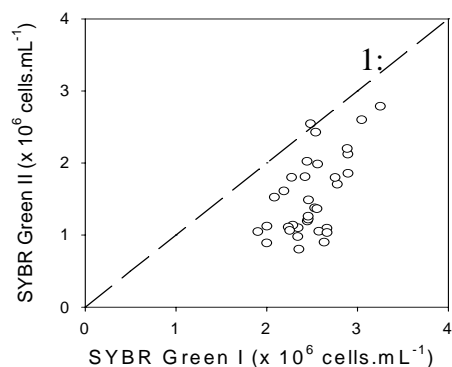
phytoplankton (FL3 channel: >630 nm) versus FL1. For each series of analysis, controls were always made in order to control and avoid the electronic noise or signals due to debris and particles other than bacteria or viruses. This “negative” control (*i.e.* without any sample) allowed us to define, when necessary, a clear-cut threshold above which a stained particle was counted as positive and was therefore included into the counting. There was always a clear difference between the signature of the viruses and that of the noise, anyway. Data were collected in listmode files and then analyzed on a separate PC using the custom-designed software CYTOWIN (Vaulot et al., 1989), which is freely available at <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html>). Abundances have been reported as cells.mL<sup>-1</sup> (heterotrophic bacteria) or particles.mL<sup>-1</sup> (viruses).

Epifluorescence counts. We used a LEICA epifluorescence microscope equipped with a mercury lamp and a blue excitation light (450-490 nm). Around 100 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<sup>-1</sup> or cells.mL<sup>-1</sup> respectively, following the procedures outlined by Noble (2001). As it is well known that microscopic counts may be very much dependent on the person counting, we performed a cross-calibration test with two different persons on 16 different samples and a fairly good correlation was found ( $r=0.62$ ,  $n=16$ ,  $p<0.05$ , data not shown).

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 (freely available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

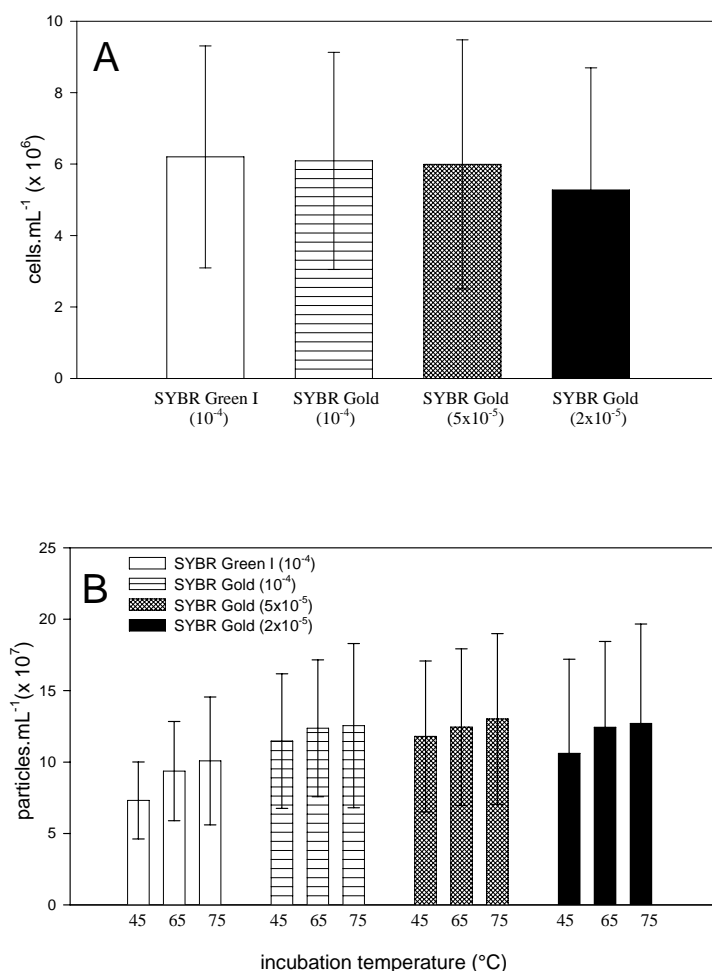
### 3. Results

Choice of the nucleic acid stain for FCM counts. When the dyes were used at a final concentration of 10<sup>-4</sup>, compared to SYBR Green I stained samples, SYBR Green II yielded 40% less bacterial numbers (Fig.1, experiment 1).



**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. Experiment 1.

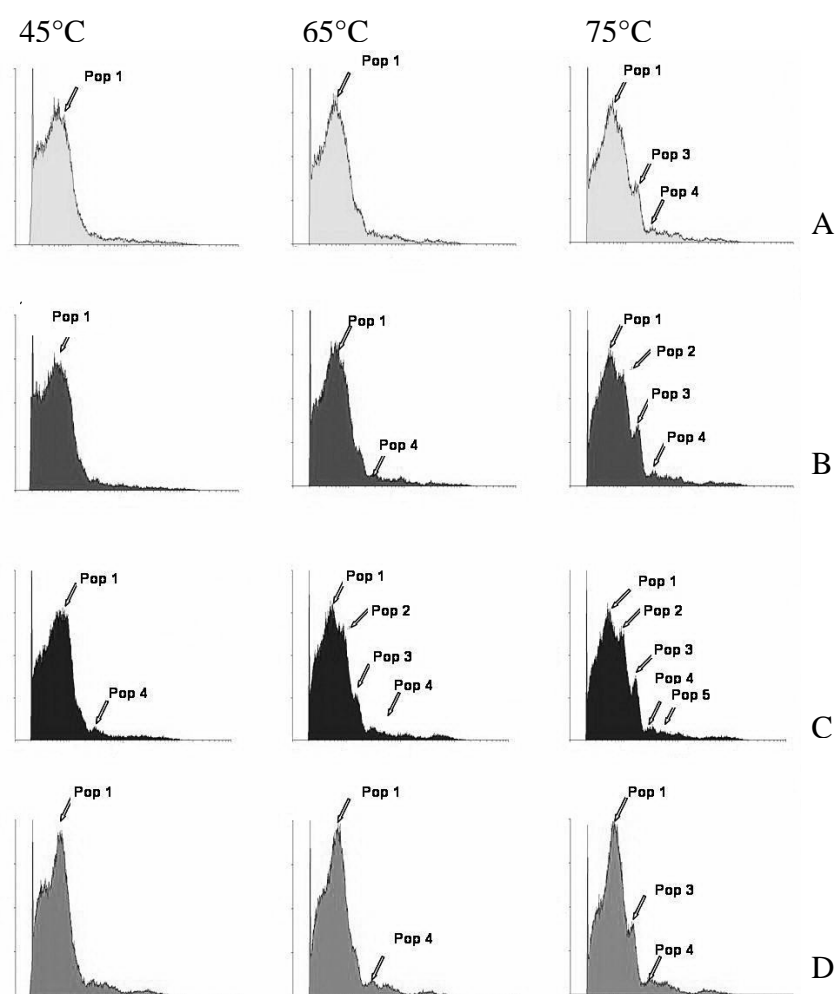
This figure also shows that the SYBR Green II counts were correlated to the SYBR Green I counts. The fluorescence of the SYBR Green I stained samples reached maximum and stable bacterial abundances after having been incubated with the dye for 10-12 min, whereas the fluorescence of those stained with SYBR Gold increased less rapidly and was less stable (experiment 3). In the latter experiment the SYBR Green I stained samples showed 16% greater abundances than the SYBR Gold stained ones. From a qualitative point of view, the bacterial signature was easier to interpret when SYBR Green I stain was used (not shown). The 4<sup>th</sup> 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. 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 ( $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  or  $2 \times 10^{-5}$ , data not shown). 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  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  or  $2 \times 10^{-5}$ , gave virus concentrations that were significantly lower (-28%, Fig. 2).



**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;  $5 \times 10^{-5}$ , dotted bars;  $2 \times 10^{-5}$ , black bars) for 12 different samples. Viruses were incubated with each dye and concentration tested at 3 different incubation temperatures ( $45^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$  and  $75^{\circ}\text{C}$ ). Error bars are relative to 12 different water samples. Experiment 4.

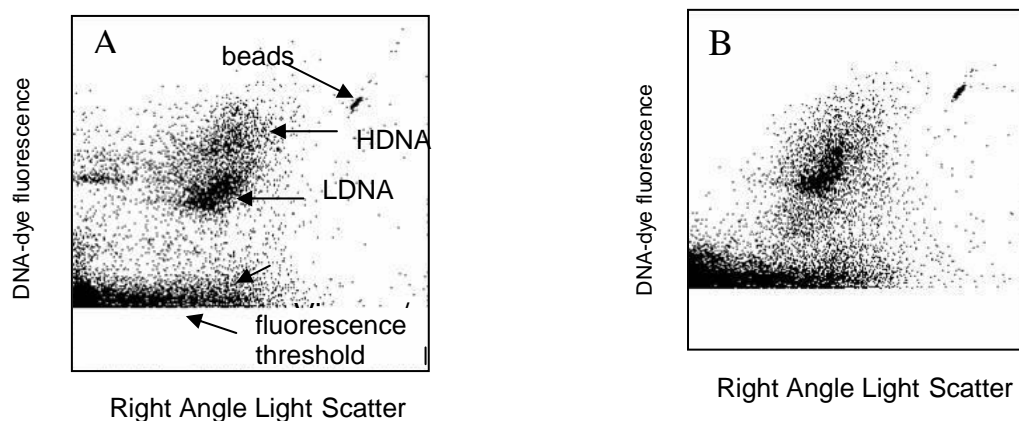
The high standard deviations led us to conclude that the samples were very heterogeneous. In addition, the temperature of incubation had a critical role on viral staining efficiency when SYBR Green I stained ( $10^{-4}$ ) with mean virus abundances being significantly lower at  $45^{\circ}\text{C}$  than at  $65^{\circ}\text{C}$  or at  $75^{\circ}\text{C}$ . Higher temperature than  $75^{\circ}\text{C}$  translated rapidly in decreasing viral numbers (not shown). 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 75°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 5<sup>th</sup> 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 Experiment 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 75°C series). Such differences were clearly confirmed here.



**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),  $5 \times 10^{-5}$  (B) or  $2 \times 10^{-5}$  (C) or with SYBR Green I at a final concentration of  $10^{-4}$  (D), and incubated at different temperatures (45°C, 65°C or 75°C) for 10 minutes. Experiment 4.

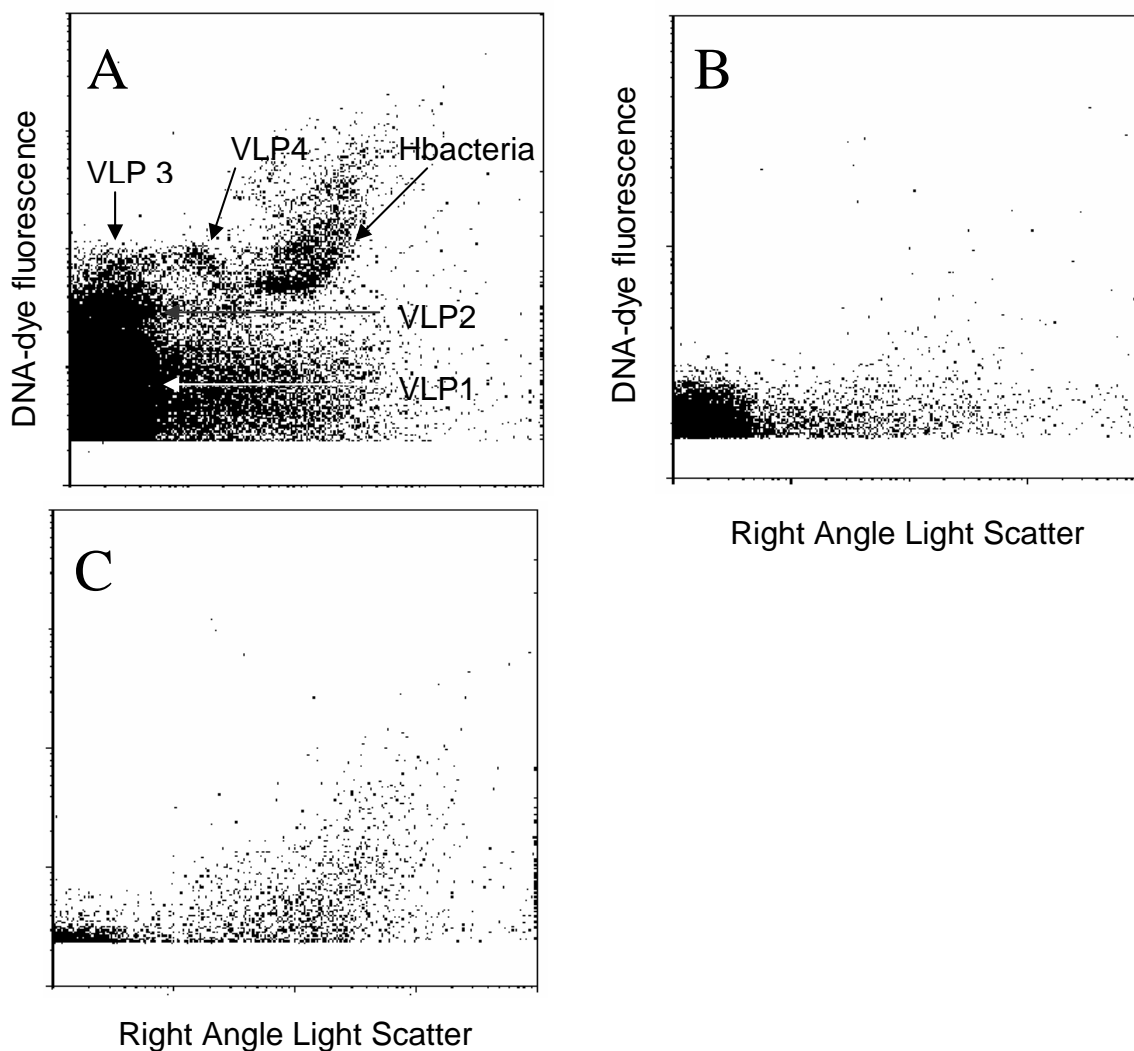
*The choice of the dilution solution for FCM counts.* Throughout the first experiment, FACSFlow and PBS used as the dilution solution provided the lowest bacterial concentrations, 16% (SYBR Green I) and 52% (SYBR Green II) less than when samples were diluted in TE. From a qualitative point of view, TE, TAE and TBE allowed to distinguish between different populations (Fig. 4A). By comparison, filtered lake water furnished the most compact signatures in combination with unfixed samples (Fig. 4B).



**Fig. 4.** Typical cytograms obtained for bacterioplankton analysis using 0.2  $\mu\text{m}$  filtered TE (A) or lake water (B) to dilute samples.

In addition to the findings of the second experiment were similar, no significant quantitative differences were observed between TE, TAE, TBE or lake water at  $t_0$  (data not shown). 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  $4^\circ\text{C}$  or at  $-20^\circ\text{C}$ , 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. Using autoclaved or non-autoclaved TE did not have any influence on the total bacterial counts found (experiment 3, data not shown). This was not the case for viruses (experiment 7). 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). Not to autoclave the 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, 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 a pH 7 or 8, nor when filtering the recently made buffer through either 0.2 or 0.02  $\mu\text{m}$ .

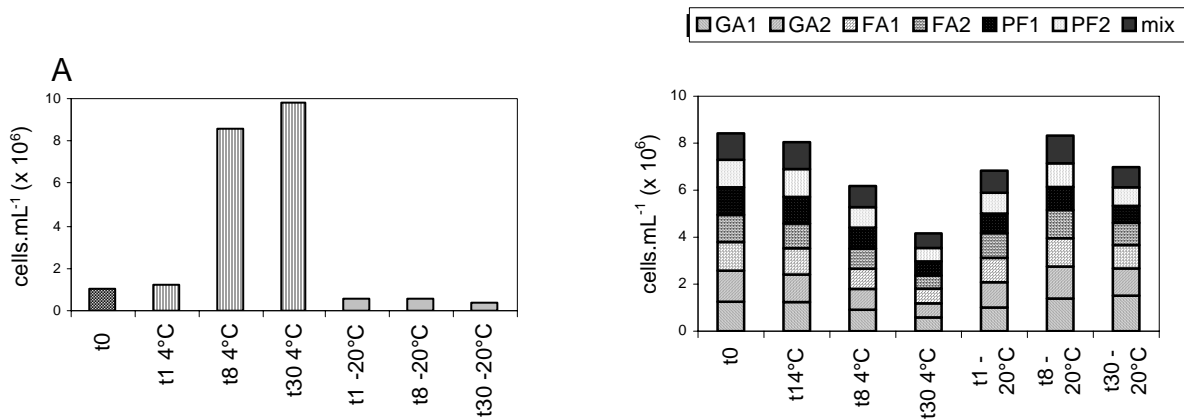


**Fig. 5.** A: Typical FCM cytogram, representing both the heterotrophic bacterial (Hbacteria) community and different viral populations (VLP) stained with SYBR Gold ( $10^{-4}$ ). B: Control cytogram with no sample and showing the signature of non-autoclaved 0.02  $\mu\text{m}$  filtered TE stained with SYBR Gold ( $10^{-4}$ ). C: Control cytogram with no sample, showing the signature of autoclaved TE stained with SYBR Gold ( $10^{-4}$ ). Experiment 7.

Choice of the fixative for FCM counts. Experiments 1 and 2 provided useful results concerning the choice of the fixative for bacterial counts (not shown). At t0, 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%. The highest number of bacteria at this time was obtained with a 2% final concentration of GA for all buffers. Up to 34% (on average 21%) more bacteria were detected in GA 2% fixed samples than in fresh ones. In our experiments, GA 1 or 2% gave the highest counts. 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, we did not observe any quantitative or qualitative difference whether fixing the samples or leaving the sample unfixed (experiment 5, not shown).

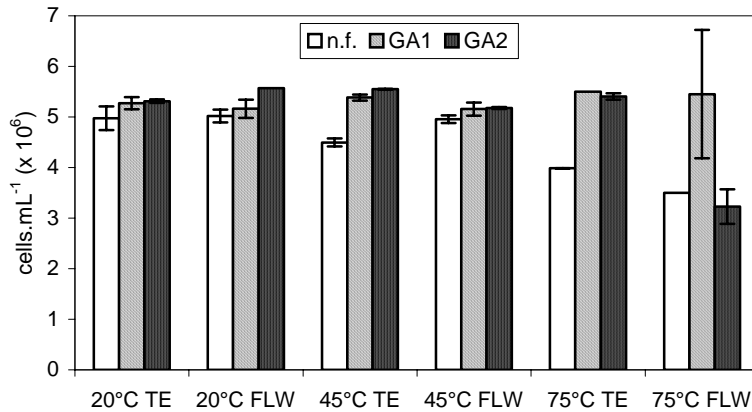
Storage conditions for FCM counts. For non-fixed samples, a significant increase occurred in bacterial abundance after storing for 8 days at 4°C, with concentrations that could be up to 8 times higher than at t0 (Fig. 6A). At t30, bacterial concentrations were up to 10 times higher than at t0. The small 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).





**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  $4^\circ\text{C}$  (hatched bars) or  $-20^\circ\text{C}$  (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  $t1$ ,  $t8$  and at  $t30$  after being stored at  $4^\circ\text{C}$  or  $-20^\circ\text{C}$ . Experiment 2.

Dye incubation temperature for FCM counts. The results of the incubation temperature experiment for bacterial analyses (experiment 6) have been illustrated in Fig. 7. With unfixed samples, the number of bacteria detected by FCM decreased significantly at temperatures above  $45^\circ\text{C}$ , at  $75^\circ\text{C}$  the number of total bacteria being reduced by an average of 22% compared to data obtained at  $20^\circ\text{C}$  or at  $45^\circ\text{C}$ . 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  $45^\circ\text{C}$  or  $75^\circ\text{C}$ , except for the samples diluted in lake water and heated to  $75^\circ\text{C}$ , for which we found significant lower concentrations. At temperature exceeding  $45^\circ\text{C}$  it appeared that samples which were diluted in TE rather than in lake water were more “protected” from overheating and cell destruction.

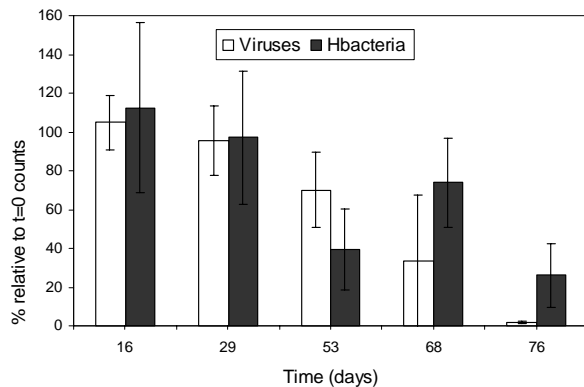


**Fig. 7.** FCM bacterial counts at  $t = 0$ . Very similar results were obtained at  $t=1$  (not shown here). Error bars represent standard deviations of duplicate counts. The samples were fixed in GA 1 or 2% or not fixed (n.f.), were diluted in 0.02  $\mu\text{m}$  filtered TE or lake water (FLW) and incubated at temperatures of 20°C, 45°C or 75°C. Experiment 6.

The results of the incubation temperature experiment for virus samples (experiment 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 75°C, respectively. At 65 or 75°C, virus counts were significantly higher (+14%) than those at 45°C. Viral numbers decreased with temperature above 75°C for a same duration of incubation of 10 minutes.

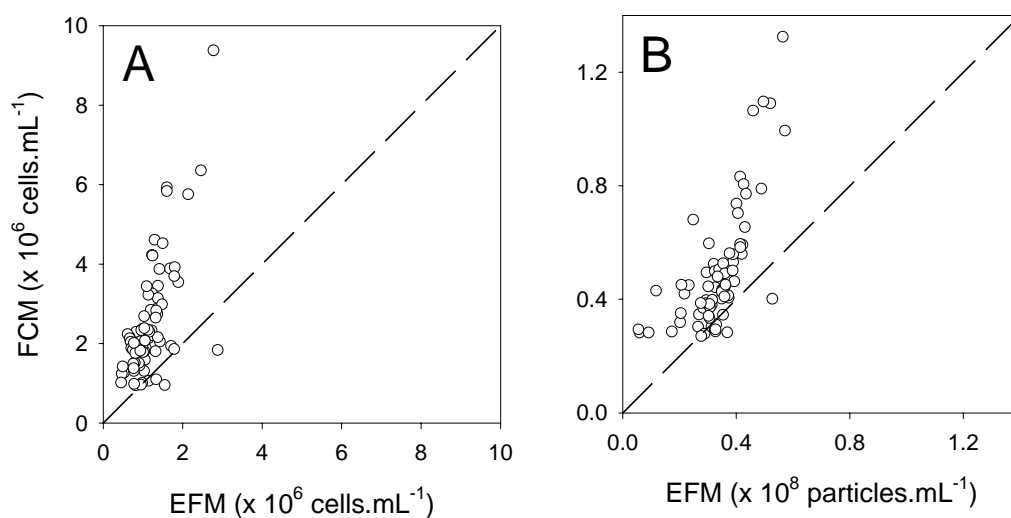
***EFM counts.*** Each filter was analyzed both for bacteria and viruses. SYBR Gold and SYBR Green I counts ( $n = 28$ ,  $r = 0.87$ ,  $p = 0.99$ ) were positively correlated and showed no significant quantitative differences. The bacterial concentrations found with SYBR Green I and SYBR Gold ranged between  $4.28 \times 10^5 - 1.76 \times 10^6$  and  $1.84 \times 10^5 - 2.56 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, respectively. Viral concentrations displayed a range of  $1.09 \times 10^7 - 5.43 \times 10^7$  viruses.mL<sup>-1</sup> with SYBR Green I, and of  $5.01 \times 10^6 - 5.73 \times 10^7$  particles.mL<sup>-1</sup> 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 and viral abundances determined by EFM after keeping the sample at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 16, 29, 53, 68 and 96 days, compared to the values obtained at  $t = 0$ . Error bars represent standard deviations of different samples ( $n = 5$ ). Experiment 8.

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  $4.54 \times 10^5$  to  $2.88 \times 10^6$  (mean  $1.19 \times 10^6$  cells.mL $^{-1}$ ), and from  $9.48 \times 10^5$  to  $9.36 \times 10^6$  (mean  $2.53 \times 10^6$  cells.mL $^{-1}$ ), using FCM. Viral abundances ranged from  $5.54 \times 10^6$  to  $5.71 \times 10^7$  (mean  $3.36 \times 10^7$  particles.mL $^{-1}$ ) by EFM, and from  $2.7 \times 10^7$  to  $1.32 \times 10^8$  (mean  $4.96 \times 10^7$  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.

#### 4. 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 ( $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  or  $2 \times 10^{-5}$ ) on different natural samples (experiment 4), the mean bacterial abundances found did not differ significantly. On the contrary, when SYBR Gold and SYBR Green I ( $10^{-4}$ , in both cases) were tested on replicate water sample (experiment 3), SYBR Green I gave as an average of 16% higher abundances than SYBR Gold. These two apparently contradictorily findings indicated that different results may be obtained for different water samples. 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), especially in organic material rich water samples (data not shown). 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 recently highlighted (Rinta-Kanto et al. 2004). Note also that we tested the recently made available SYBR Safe from Molecular Probes by comparison with SYBR Green I. Here again, SYBR Green I was more sensitive and gave significant higher fluorescent signatures and higher values for both bacterial and viral abundances, whatever the dilution solution or temperature of incubation used (Jacquet,

unpublished). With regard to the dilution solutions, we strongly advise against using FACSFlow or PBS provided or recommended by the FCM manufacturer. 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 had already been reported by Gasol et al. (1999) and by Li et al. (2001). They named them HDNA (for high DNA containing cells) and LDNA (for low DNA containing cells), or type I and II, respectively. Bacteria belonging to the HDNA or to type-I group are thought to be metabolically more active than those in the LDNA or type-II group (Gasol et al., 1999; Lebaron et al., 2002). 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 and 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  $t = 1$  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  $t_0$ . 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 and 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. Brussard (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 and 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 N<sub>2</sub> may circumvent problems mentioned above by preventing severe loss of abundance (Brussard, 2004). We did not test this procedure as our laboratory was not equipped at that time with liquid nitrogen, which may probably be the case for some other research laboratories.

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  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  or  $2 \times 10^{-5}$ , 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  $75^{\circ}\text{C}$ , 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  $45^{\circ}\text{C}$  to  $75^{\circ}\text{C}$ ). 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, Brussard (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  $5 \times 10^{-5}$ . 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  $45^{\circ}\text{C}$  to  $65^{\circ}\text{C}$ , but there was no significant increase from  $65^{\circ}\text{C}$  to  $75^{\circ}\text{C}$ . 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 and 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. Brussard (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  $\mu\text{m}$  or 0.2  $\mu\text{m}$ , if it was autoclaved, a 30% overestimation of low fluorescence populations, and thus of the total count, could be prevented by removing the background noise in the critical part of the cytogram. As indicated by Brussard (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. Brussard's study (Brussard, 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.

*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 (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 and 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<sup>-1</sup>. 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 (Noble, 2001) limited 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 and 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. Typically, FCM counts of bacteria and viruses were 2.13 and 1.47 times higher respectively than the corresponding EFM counts. Another study, conducted by the end of 2004 within our research laboratory confirmed again this trend with factors of 2.42 and 2.07 for bacteria and viruses, respectively (not shown). 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 and coworkers (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 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- $\mu\text{m}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  (Tab. 2). To summarize for FCM counts of freshwater virioplankton, we recommend using SYBR Gold at a low concentration ( $2 \times 10^{-5}$ ) 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  $75^{\circ}\text{C}$ , and the dilution solution recently autoclaved and 0.02 (or 0.2)-  $\mu\text{m}$  filtered TE buffer adjusted to a final pH of 7 or 8 (Tab. 2). 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).

**Tab. 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- $\mu\text{m}$

|                         | FCM                                  |                                      | EFM  |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
|                         | Bacteria                             | Viruses                              | Bacteria and Viruses                       |
| Fixation                | GA 2 %                               | n.n.                                 | n.n.                                       |
| Staining with           | SYBR Green I<br>( $10^{-4}$ )        | SYBR Gold<br>( $2 \times 10^{-5}$ )  | SYBR Gold<br>( $10^{-3}$ )                 |
| Staining time           | 15 min                               | 15-30 min                            | n.t.                                       |
| Dilution solution       | TE <sup>a</sup> (n.n.<br>autoclaved) | TE <sup>a</sup> (autoclaved, pH 7-8) | No dilution                                |
| Incubation T (°C)       | Room temperature                     | 75°C                                 | n.t.                                       |
| Analyses recommended at | T = 0 (or after 1<br>day)            | T = 0                                | T = 0-30 days if slides stored<br>at -20°C |
| Storage                 | 1 day at 4°C                         | Not reliable                         | 1 month at -20°C                           |

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.

## References

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. and 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. and Heldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**, 467-468.
- Bergström, A.-K. and 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**(1), 139-147.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Carrias, J. F. and Portelli, C. (2003). Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophic status. *Freshwater Biology* **48**, 810-822.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C. and Dolan, J. (2004). Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(5), 2941-2951.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C. and Laveran, H. (2000). A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(6), 2283-2289.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Carrias, J. F., Sargos, D., Garabétian, F. and Lavandier, P. (2003). Viral lysis, flagellate grazing potential, and bacterial production in lake Pavin. *Microbial Ecology* **45**, 119-127.
- Børsheim, K. Y., Bratbak, G. and Heldal, M. (1990). Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(2), 352-356.
- Bratbak, G. and Heldal, M. (1993). Total count of viruses in aquatic environments. *Handbook of methods in aquatic Microbial Ecology*. S. Kemp, Sherr, Cole. Boca Raton Fla., Lewis Publisher: 135-138.
- Brussard, C. P. D. (2004). Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(3), 1506-1513.
- Brussard, C. P. D., Marie, D. and 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. and 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**(2), 539-545.
- Dingman, C. W. and Peacock, A. C. (1968). Analytical studies on nuclear ribonucleic acid using polyacrylamide gel. *Biochemistry* **7**, 659-668.
- Domaizon, I., Viboud, S. and 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.
- Ferris, M. M., Stoffel, C. L., Maurer, T. T. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and Schleifer, K.-H. (1996). An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic Applied Microbiology* **19**, 403-406.
- Gundersen, K., Bratbak, G. and Heldal, M. (1996). Factors influencing the loss of bacteria in preserved seawater samples. *Marine Ecology Progress Series* **137**, 305-310.
- Hara, S., Terauchi, K. and 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. 226, Van Nostrand Reinhold CO., New York
- Hennes, K. P. and Suttle, C. A. (1995). Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography* **40**(6), 1050-1055.
- Jacquet, S., Lennon, J. F. and Vaultot, 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 Flaten, G. A., Sandaa, R. A., Castberg, T., Thyrraug, R., Rune Erga, S., Jacquet, S. and Bratbak, G. (2004). Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography* **49**(1), 180-190.
- Lebaron, P., Parthuisot, N. and 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. and Parthuisot, N. (1998b). Effectiveness of SYTOX green stain for bacterial viability assessment. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(7), 2697-2700.
- Lebaron, P., Servais, P., Baudoux, A.-C., Bourrain, M., Courties, C. and 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. and 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. and Dickie, P. M. (2001). Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry* **44**, 236-246.
- Lisle, J. T., Hamilton, W. A., Willse, A. R. and McFeters, G. A. (2004). Comparison of fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(9), 5343-5348.

- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S. and 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**(1), 186-193.
- Marie, D., Partensky, F., Vaultot, D. and Brussaard, C. (1999a). Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. *Current Protocols in Cytometry*. New York, John Wiley and Sons, Inc: 11.11.11-11.11.15.
- Marie, D., Brussaard, C. P. D., Thyrrhaug, R., Bratbak, G. and Vaultot, D. (1999b). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(1), 45-52.
- Middelboe, M. and Glud, R. N. (2003). Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnology and Oceanography* **48**(4), 1447-1456.
- Navaluna, N. A., Perry, M. J. and Talbot, M. C. (1989). The effects of chemical fixation on some optical properties of phytoplankton. *Journal of Plankton Research* **11**, 15-24.
- Noble, R. T. (2001). Enumeration of viruses. *Marine Microbiology, Methods in Microbiology*. J. H. Paul. NY, Academic Press. **30**, 43-51.
- Noble, R. T. and 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. and Deborah, A. (1987). Guide to molecular cloning techniques. *Methods in Enzymology*. S. L. a. A. R. K. e. Berger. Orlando (Florida), Academic Press Inc.: 75-78.
- Øvreås, L., Bourne, D. G., Sandaa, R. A., Casamayor, E. O., Benlloch, S., Goddard, V. J., Smerdon, G., Heldal, M. and 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. and 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. and Fuhrman (1990). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* **343**, 60-62.
- Rinta-Kanto, J. M., Lehtola, M. L., Vartiainen, T. and 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. and Wilson, W. H. (2003). Virus succession observed during an *Emiliana huxleyi* bloom. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(5), 2484-2490.
- Shopov, A., Williams, S. C. and 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. and Vyhnaek, V. (1990). Uptake of bacteria-sized fluorescent particles by natural protozoan assemblage in a reservoir. *Archiv fuer Hydrobiologie Beiheft*. **34**, 275-281.
- Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M. G., Hornak, K., Dolan, J. R., Nedoma, J., Mašín, M. and 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**(6), 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. and Sean, K. (2003). The imprint of wild viruses on freshwater microbial ecology. *Recent Research Development In Microbiology* **7**, 481-497.
- Troussellier, M., Courties, C. and Zettelmaier, 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. and 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. and Partensky, F. (1989). A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry* **10**, 629-635.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P. and 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. and Valois, F. W. (1977). Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* **33**(4), 940-946.
- Weinbauer, M. G. and Rassoulzadegan, F. (2004). Minireview: Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* **6**(1), 1-11.



- Wen, K., Ortmann, A. C. and Suttle, C. A. (2004). Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(7), 3862-3867.
- West, C. A., He, C., Su, M., Swanson, S. J. and 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. and Suttle, C. A. (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea. *BioScience* **49**(10), 781-787.
- Wommack, K. E. and Colwell, R. R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**(1), 69-114.
- Xenopoulos, M. A. and Bird, D. F. (1997). Virus à la sauce Yo-Pro: Microwave-enhanced staining for counting viruses by epifluorescence microscopy. *Limnology and Oceanography* **42**(7), 1648-1650.

# GLOSSAIRE



---

## GLOSSAIRE

**Abiotique** : Tout paramètre chimique ou physique non vivant d'un milieu.

**Allochtone** : Le terme **allochtone** *originale d'ailleurs*, du grec *allos*, étranger, et *chthonos*, origine.

**Autochtone** : Signifie littéralement *originale d'ici*.

**Biocœnose** : ensemble des êtres vivants peuplant un écosystème

**Biomasse** : Masse totale de tous les organismes ou de l'un des groupes vivant dans une zone donnée

**Biome** : communauté vivante qui se rencontre sur des vastes surfaces en milieu continental (déserts, savanes, forêts..)

**Biotope** : ensemble des éléments physico-chimiques (minéraux du substrats, température...) qui caractérisent un milieu vivant

**Biotique** : qui a pour origine un être vivant

**Boucle microbienne** : traduit de l'anglais « microbial loop » ou « microbial food web » : caractérise les micro-organismes liés par des relations trophiques (prédation, compétition, lyse virale, recyclage,..)

**Broutage** : Consommation de particules organiques vivantes (bactéries algues) ou mortes (détritus) par le zooplancton filtreur.

**Clone** : Sauf erreur ou mutation lors du recopiage, le clone est génétiquement identique à l'original : il a le même ADN.

**Communauté** : se dit des populations de toutes les espèces occupant un habitat particulier et interagissant avec ce dernier

**Dénitrification** : Réduction microbienne des nitrates en nitrites, voire même jusqu'à l'azote élémentaire

**Eau douce** : Eau très peu chargée en sels dissous, ayant un degré hydrométrique inférieur à 4 ou 5. Ce terme désigne également les eaux continentales, souterraines ou superficielles (fleuves, lacs, etc.) par opposition aux eaux riches en chlorure de sodium

**Ecologie** : Biologie de l'environnement, qui étudie les rapports entre organismes ou groupes d'organismes et leur milieu ambiant.

**Epilimnion** : Couche aquatique supérieure d'un lac située, au cours de la stagnation estivale, au-dessus de la couche du saut thermique (métalimnion); dans cette dernière, la transition thermique s'effectue de façon brusque. L'épilimnion disparaît lors de la circulation automnale des eaux du lac.

**Embouchure** : Ouverture par laquelle un cours d'eau se jette dans une mer ou un lac.

**Famille** : ensemble homogène de genres distincts

**GenBank** : Une banque de séquences nucléotidique

**Gène** : matériel génétique codant l'information pour une seule chaîne polypeptidique ou alors pour de l'ARN

**Génome** : ensemble des gènes (et des partie non codantes) d'un individu

**Genre** : unité de classification réunissant des espèces très voisines au niveau de leur origine, de leur morphologie et de leur écologie

**Hôte** : organisme qui héberge un parasite et lui assure son alimentation pour se développer et se reproduire

**Hotspot** : Un hot-spot de biodiversité est une zone géographique, qui présente à la fois une biodiversité et une richesse en espèces faunistiques et floristiques élevées, et qui encourent des risques d'extinction importants à court terme. On dénombre actuellement 35 Hot-spots à travers le monde, dont le bassin méditerranéen.

**Hypolimnion** : Couche aquatique inférieure d'un lac lors de la stagnation estivale. Cette partie se trouve au-dessous de la couche du saut thermique, et est caractérisée par une basse température.

**Lyse** : la lyse correspond à l'éclatement d'une cellule

**Lysogénie** : l'ADN viral est intégré dans le matériel génétique de la cellule hôte sous une forme relativement stable

**Méromictique** : Désigne des lacs caractérisés par une stratification permanente de leurs eaux profondes. De façon générale, cet état s'observe dans les biotopes limniques de grande profondeur, ce qui entrave la circulation annuelle verticale. Il se crée alors une couche d'eaux stagnantes et anoxiques dénommée monimolimnion par opposition aux couches qui les surmontent soumises à l'homogénéisation printanière et automnale.

**Métagénome** : L'analyse génomique d'une population de microorganismes

**Métalimnion** : couche intermédiaire ou transitoire d'un lac stratifié, zone entre l'épilimnion où l'eau est bien mélangée et l'hypolimnion où l'eau est froide. Cette couche contient la thermocline, mais est généralement définie en fonction du profil des températures.

**Microorganisme** : tout organisme microscopique telles que les bactéries, les virus et les algues unicellulaires

**Monomictique** : Qualifie un lac ne présentant qu'un stade annuel de circulation des eaux et de mélange avec les couches profondes. Il s'agit de lacs subpolaires ou situés en très haute montagne, dans lesquels la température des eaux est toujours inférieure à 4°C.

**Niche écologique** : place et spécialisation d'une espèce à l'intérieur d'un écosystème

**Nitrification** : Processus d'oxydation de l'ammoniac et des nitrites en nitrates, grâce à des micro-organismes appropriés, par exemple dans un milieu aqueux

**Oligotrophe, mésotrophe, eutrophe** : se dit respectivement d'un milieu pauvre, moyennement riche et riche en nutriments. Les critères permettant de définir le niveau trophique d'une région aquatique sont généralement la quantité de chlorophylle par unité de volume ou encore la concentration en nutriments. Le tableau ci-dessous décrit cela.

**OTU** : Unité opérationnelle taxonomique : grâce à des analyses génétiques, des distances phylogénétiques sont calculés afin de regrouper des organismes selon leur ressemblance évolutive

**Parasite** : Espèce vivant obligatoirement en association étroite avec une espèce hôte qui l'héberge et se développant aux dépens de cette dernière au plan trophique. Le parasite est donc entièrement dépendant de l'hôte pour son métabolisme tandis que l'hôte est affecté défavorablement par la présence du parasite.

**Pélagique** : Se dit d'une zone d'eau libre n'appartenant pas au voisinage immédiat des rives et du fond (l'inverse de benthique)

**Plancton** : Ensemble de micro-organismes en suspension dans l'eau. Il est composé de plancton végétal (phytoplancton) et de plancton animal (zooplancton). Selon le milieu, on distingue : 1) le limnoplanton (plancton lacustre), 2) l'hélioplanton (plancton des étangs et des mares), 3) le potamoplanton (plancton des eaux courantes). La dimension du plancton se situe entre environ 2 et 2000 microns.

**Phylum (lignée)** : Série évolutive de formes animales, végétales, bactériennes...

**Phytoplancton** : portion végétale du plancton.

**Plancton** : Ensemble des êtres microscopiques en suspension dans l'eau

**Pollution** : Action d'un polluant dans un milieu ou une communauté biologique et résultat de cette action. Action de polluer, de rendre dangereux, de dégrader un milieu naturel en répandant des produits toxiques, des agents pathogènes ou en dégradant le site. « L'apparition de certaines conditions de l'environnement vis-à-vis desquelles la communauté vivante possède des informations inadéquates et se trouve par conséquent dans l'impossibilité de fournir une réponse convenable »

**Prédateur** : Organisme qui se nourrit d'organismes d'une autre espèce, laquelle appartient au maillon précédent la chaîne alimentaire prédatrice.

**Protiste** : Micro-organisme unicellulaire avec noyau soit animal, soit végétal (protophyte).

**Shot-gun** : Cette méthode consiste à découper l'ADN étudié en tout petits morceaux à l'aide d'enzymes, sans trop se soucier de l'endroit où la coupure est faite. Une fois ce découpage aléatoire effectué, il faut séquencer chaque clone suite au clonage des fragments obtenus.

**Symbiose** : Interaction interspécifique entre deux ou plusieurs organismes, qui représente une relation positive et obligatoire pour les deux partenaires profitant de cette relation

**Taxonomie** : Science des lois de classification des êtres vivants.

**Trophogène** : Ensemble des couches aquatiques supérieures (épilimnion d'un lac) où, sous l'action de la lumière, s'effectue la synthèse de substances organiques, par l'activité du phytoplancton et des végétaux des rives.

**Xénobiotique** : Substance chimique de synthèse. Ce terme désigne ce qui est étranger à la vie (= substance, molécule, étrangères à la biosphère). D'où, par extension : molécules chimiques de synthèse étrangères à l'organisme et résistantes à la biodégradation ; ou substance possédant des propriétés toxiques même à faible concentration (*ex.* : pesticides).

**Tab. 20.** Classification trophique des lacs selon la teneur des eaux en nutriments (Pourriot et Meybeck, 1995).

| Catégorie trophique | Phosphore total<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | Chlorophyll $\mu\text{g/L}^*$ | Transparence*<br>(Secchi, m) |
|---------------------|--|-------------------------------|------------------------------|
| Ultraoligotrophe    | <4                                     | <1                            | >12                          |
| Oligotrophe         | 10                                     | <2,5                          | >6                           |
| Mesotrophe          | 10-35                                  | 2,5-8                         | 6-3                          |
| Eutrophe            | 35-1000                                | 8-25                          | 3-1,5                        |
| dystrophe           | >100                                   | >25                           | <1,5                         |

\*moyenne annuelle

## PUBLICATIONS DE L'AUTEUR





## PUBLICATIONS DE L'AUTEUR

1. Dorigo U. & C. Leboulanger. 2001. A PAM fluorescence-based method for assessing the effects of photosystem II herbicides on freshwater periphyton. **Journal of Applied Phycology** 13: 509-515.
2. Bérard A., U. Dorigo, J.F. Humbert, C. Leboulanger & F. Seguin. 2002. La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales. Intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. **Annal. Limnol.** 38 (3):247-261.
3. Leboulanger C., U. Dorigo, S. Jacquet, B. LeBerre, G. Paolini & J.F. Humbert. 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. **Aquat. Microb. Ecol.** 30: 83-89.
4. Dorigo U., A. Berard & J.F. Humbert. 2002. Comparison of eukaryotic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. **Microbial Ecology** 4: 372-380.
5. Bérard A., U. Dorigo, I. Mercier & C. Leboulanger. 2003. Comparison of the ecotoxicological impact of the triazine Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in lake Geneva. **Chemosphere** 53: 935-944.
6. Dorigo U., X. Bourrain, A. Bérard & C. Leboulanger. 2003. Seasonal changes in river microalgae sensitivity to atrazine and isoproturon, along a contamination gradient. **The Science of the Total Environment** 318: 101-114.
7. Dorigo U., S. Jacquet & J.F. Humbert. 2004. Cyanophage Diversity Inferred from g20 Gene Analyses in the Largest Natural French Lake, Lake Bourget. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 1017-1022.
8. Bérard A., U. Dorigo, J.F. Humbert & F. Martin-Laurent. 2005. Development of rDNA extraction and amplification methods for studying soil microalgae community structure as potential bioindicators of soil contamination. **Agronomie.** 25: 1-7.
9. Dorigo U., L. Volatier, D. Fontvieille & J.F. Humbert, 2005. Use of molecular approaches for studying biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research.** 39: 2207-2218.10.
10. Humbert J.F. & U. Dorigo. 2005. Biodiversity and aquatic ecosystem functioning: a minireview. **Aquatic Ecosystem Health and Management** 8 (3) XX-XX
11. Dorigo U., D. Fontvieille & J.F. Humbert. Spatial variability in the abundance and composition of the bacterioplankton community of the Lac du Bourget (France). **Soumis à FEMS Microbial Ecology.**
12. Personnic, S., U. Dorigo & S. Jacquet. Flow cytometric analyses of microbial communities (viruses, bacteria and phytoplankton) on lakes Annecy, Bourget and Geneva, France. **En préparation pour Aquatic Microbial Ecology.**
13. Dorigo U., S. Personnic & S. Jacquet. Necessary tests for accurate counting of freshwater microbial communities using either flow cytometry or epifluorescence microscopy. **Soumis à Water Research**
14. Dorigo U., D. Fontvieille & J.F. Humbert. Comparative study on the composition of the freshwater eubacterioplankton community in three deep French Alpine lakes of different trophic status. **Limnology and Oceanography.** Soumis.
15. Domaizon, I., U. Dorigo, S. Personnic, J. Comte, A. Mbade Sene, A. Millery & S. Jacquet. Assessment of protozoan predation impact on aquatic bacteria: *in situ* experimental approaches. **En préparation.**

16. Jacquet, S., T. Sime-Ngando, U. Dorigo, A. Millard, B. Leberre, J. Lepault & B. Delmas. A new virus infecting PE-rich freshwater picocyanobacteria. **En préparation.**
17. Sime-Ngando, T., I. Domaizon, U. Dorigo, S. Personnic, P. Perney & S. Jacquet. Diel patterns of virus-bacteria interactions at two different periods of the year in the largest natural French lake. **En preparation.**

« *Acta est fabula* »

*Augusto*





