

## **Importance de la lysogénie dans trois lagunes méditerranéennes: une étude saisonnière au niveau cellulaire**

L. Castañeyra-Ruiz\*, C Maurice, R De Wit  
Laboratoire des Ecosystèmes Lagunaires,  
CNRS-UMR 5119 Université de Montpellier II, Equipe d'Ecologie Microbienne des Milieux  
Aquatiques – Bâtiment 24  
\*E-m: [castaney84@gmail.com](mailto:castaney84@gmail.com)

### **Resumen**

#### **Importancia de la lisogenia en tres lagunas mediterraneas: un estudio estacional a nivel celular**

Los virus juegan un papel fundamental en la ecología acuática, ya que actúan directamente en los flujos de materia y energía, regulando dos procesos de vital importancia; el bucle microbiano y la bomba biológica, (mecanismos que permiten la reutilización de nutrientes por el fitoplancton y la disminución de la producción de CO<sub>2</sub>) la manera de influir en estos procesos, es mediante el control de las poblaciones bacterianas, para ello los virus poseen diferentes mecanismos reproductivos que destruyen las bacterias. El que mayor peso tiene en la regulación de la ecología acuática es el ciclo Lisogénico, que se trata de un estado de inactividad en el que la cadena nucleotídica del virus se mantiene asociado al cromosoma bacteriano, hasta que se produce algún cambio ecológico que permite la inducción de la actividad lítica del virus. De esta manera la tendencia lisogénica o lítica de los virus pueden ser indicadores de las condiciones ecológicas de un lugar determinado. El objetivo de este trabajo es conocer las variaciones estacionarias de un ecosistema y sus relaciones con la tendencia lisogénica. Este estudio se realizó en tres lagos semicerrados cercanos al Mediterráneo Francés, Salses-Leucate, Bages-Sigean et Gruissan, desde Febrero hasta Julio de 2008.

Se observó que existían en los diferentes lagos, picos de máxima tendencia lisogénica y una disminución radical de la abundancia viral, y una disminución de la concentración bacteriana. En algunos momentos del estudio, coincidiendo con variaciones fisicoquímicas importantes, como por ejemplo el incremento de la salinidad.

La tendencia lisogénica se produce como un mecanismo de defensa que permite la supervivencia viral, en condiciones desfavorables, como se demuestra en el caso de Salses-Leucate, donde un incremento radical de la Salinidad induce la desaparición de virus libres y el incremento extremo de la tendencia lisogénica, además del aumento de la respiración, bacteriana.

Los virus, que son entidades casi inertes no pueden adaptarse a los cambios producidos a su alrededor, por tanto para poder adaptarse a cambios ecológicos sigue una tendencia lisogénica que le permite sobrevivir en el interior de las bacterias, que sí pueden adaptarse a las condiciones extremas, debido a su capacidad de

interactuar con el medio que le rodea. De esta manera el incremento en la respiración se debe a los esfuerzos bacterianos para sobrevivir a las nuevas condiciones.

### **Palabras clave**

Virus, ecología acuática, lisogenia, lagos mediterraneo.

### **Summary**

#### **Significance of lysogeny in three lagoons Mediterana: a seasonal study at the cellular level.**

Viruses play a key role in aquatic ecology, since they act directly on the flows of matter and energy, regulating two processes of vital importance, the microbial loop and the biological pump (mechanisms that allow the reuse of nutrients by phytoplankton and the decrease in CO<sub>2</sub> production) how to influence these processes is by regulating bacterial populations to viruses that have different reproductive mechanisms that destroy bacteria. The lysogenic cycle has the greatest importance in regulating aquatic ecology; this is an idle state in which the nucleotide chain of the virus remains associated with the bacterial chromosome, until some environmental change occurs, which allows induction of the lytic activity of the virus. Thus the trend of lysogenic or lytic viruses can be indicators of the ecological conditions of a particular location. The aim of this study was to determine the seasonal variations of an ecosystem and its relations with the trend lysogenic. This study was conducted in three lakes near the Mediterranean semi-French, Salses-Leucate, Bages-Sigean et Gruissan, from February to July 2008.

In the various lakes were noted, high peaks and a decrease trend lysogenic radical viral abundance, and a decrease in bacterial concentration. At certain times of the study, were coinciding with significant physicochemical changes, such as increased salinity.

Lysogenic trend occurs as a defense mechanism that allows viral survival in adverse conditions, as demonstrated in the case of Salses-Leucate, where a radical increase in the salinity induces the disappearance of free virus and the extreme increase lysogenic trend, besides the increase of respiration, bacterial.

Viruses, which are almost inert bodies can not adapt to changes around them, so in order to adapt to ecological changes lysogenic follows a trend that allows it to survive inside the bacteria, which if they can adapt to extreme conditions because of its ability to interact with his environment. Thus the increase in breathing is due to

bacterial efforts to survive the new conditions.

**Key words**

Virus, aquatic ecology, lysogeny, Mediterranean lakes.

**Raport**

**Importance de la lysogénie dans trois lagunes méditerranéennes: une étude saisonnière au niveau cellulaire**

Les virus jouent un rôle fondamental dans l'écologie aquatique, puisqu'ils agissent directement les flux matière et énergie, en réglant deux processus d'importance vitale ; la boucle microbienne et la bombe biologique, (mécanismes qui permettent la réutilisation de nutriments par le phytoplancton et la diminution de la production de CO<sub>2</sub>) la manière d'influencer ces processus, est par le contrôle des populations bactériennes, pour cela les virus possèdent différents mécanismes reproducteurs qui détruisent les bactéries. Celui qu'un plus grand poids a dans le règlement de l'écologie aquatique c'est le cycle Lysogénique, qu'il s'agit d'un état d'inactivité dans lequel la chaîne nucléotidique du virus on maintient associé au chromosome bactérien, jusqu'à ce que se produise un certain changement écologique qui permet l'induction de l'activité lytique du virus. De cette manière la tendance lysogénique ou lytique des virus peuvent être indicateurs des conditions écologiques d'un lieu déterminé. L'objectif de ce travail est de connaître les variations stationnaires d'un écosystème et ses relations avec la tendance lysogénique. Cette étude a été effectuée dans trois Lagos semi-fermés proches la Méditerranée française, à Salses-Leucate, Bages-Sigean et Gruissan, depuis février jusqu'à juillet 2008.

On a observé qu'il existait à Lagos différent, bouts de tendance lysogénique maximale et une diminution radicale de l'abondance virale, et une diminution de la concentration bactérienne. À quelques moments de l'étude, coïncidant avec d'importantes variations physico-chimiques, comme par exemple l'accroissement de la salinité.

La tendance lysogénique se produit comme un mécanisme de défense qui permet la survie virale, dans des conditions défavorables, comme il est démontré dans le cas de Salses-Leucate, où un accroissement radical de la Salinité induit la disparition de virus libres et l'accroissement extrême de la tendance lysogénique, outre l'augmentation de la respiration, bactérienne. Les virus, qu'ils sont des organismes presque inertes ne peuvent pas s'adapter aux changements produits à son à autour, par conséquent pour pouvoir s'adapter à des changements écologiques il suit une tendance lysogénique qui lui permet de survivre dans les bactéries, qui s'ils peuvent s'adapter aux conditions extrêmes, étant donné sa capacité d'interagir avec le milieu qui l'entoure. De cette manière ce qui est incrémenté dans la respiration doit aux efforts bactériens pour se survivre aux nouvelles conditions.

**Mots-clés**

Virus, écologie aquatique, lysogénie, lacs

**Introduction**

Les virus jouent un rôle très important en écologie aquatique, puisqu'ils ont une grande importance dans les

flux de matière et d'énergie, mais cette importance est uniquement due à leur capacité d'interaction avec les cellules hôte, puisque seuls, les virus sont des unités presque inertes, incapables de respirer et de consommer des nutriments. L'importance des virus sur le compartiment microbien a été décrite à travers la boucle microbienne [17], qui est un phénomène clé dans le fonctionnement et la compréhension des processus biogéochimiques des milieux aquatiques. Les bactériophages jouent un rôle très important dans cette boucle, puisqu'ils sont capables de moduler les flux de carbone à travers la chaîne alimentaire, on a même démontré que les virus agissent comme catalyseurs de la transformation des nutriments de l'état particulaire à l'état dissous [13]. En effet lorsqu'une cellule hôte est lysée, les débris cellulaires libérés peuvent être utilisés par d'autres bactéries et par le phytoplancton, comme éléments nutritifs. Ce processus est connu comme la boucle virale où il a été démontré que 6 à 26 % du carbone fixé par photosynthèse est recyclé en matière organique dissoute par la lyse virale [20,21, 23].

D'un autre côté, cet effet viral peut aussi intervenir sur la pompe biologique, qui correspond à la capacité d'absorption de CO<sub>2</sub> des systèmes marins [20]. Les virus influencent le fonctionnement de cette pompe biologique, car en lysant les bactéries, ils régulent la production de CO<sub>2</sub> issue de la respiration bactérienne [16].

L'importance des bactériophages, en écologie aquatique s'appuie sur la capacité de réguler les populations de cellules hôte, donc si on veut savoir l'importance des virus sur l'écologie aquatique il faut étudier la relation entre eux et leurs hôtes.

Il existe quatre types de cycles de reproduction viraux: le cycle chronique, lytique, lysogénique et pseudolysogénique [1,2]. Les proportions exactes de chaque cycle ne sont pas connues; cependant les cycles plus décrits sont le lytique et le lysogénique, et la tendance majoritaire (lytique ou lysogénique) est très souvent mis en rapport avec les conditions écologiques d'un écosystème déterminé. Dans le cycle lytique après la fixation et la pénétration du matériel génétique viral il y aura directement transcription de l'information génétique virale pour réaliser la multiplication et la production de nouvelles particules virales, qui seront libérées lors de la lyse cellulaire. C'est ce phénomène qui est important dans la libération de la matière organique dissoute (boucle virale) et dans l'intervention du retour du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère (pompe biologique) [4,20]. Dans le cycle lysogénique, il y a intégration du bactériophage dans le génome de la bactérie hôte. La bactérie continue ses fonctions vitales pendant que le virus se maintient sous forme de latence (prophage). Ainsi lorsque l'ADN bactérien est doublé, l'ADN viral est doublé aussi et il est transmis aux cellules filles. Sous certaines conditions environnementales, l'ADN viral s'excise et reprend les phases caractéristiques du cycle reproductif lytique. On parle alors d'induction du cycle lytique. La dominance d'un cycle sur l'autre peut être un indicateur des conditions écologiques d'un système déterminé, puisque la présence d'un cycle ou

l'autre dépend de caractéristiques environnementales, telles que la température, les rayonnements ultraviolet, les concentrations en nutriments, l'abondance bactérienne, le niveau d'altération de l'hôte et la salinité [7,8,10, 19, 23,24].

L'objectif principal de ce travail est de mieux comprendre comment varie la lysogénie pendant une période de temps déterminée. Ainsi, on peut suivre les variations saisonnières de l'écosystème et leurs relations avec la tendance lysogénique.

Pour étudier l'influence de la lysogénie en écologie aquatique, nous avons travaillé dans un milieu où l'on peut voir de nombreuses variations physicochimiques à courte échéance. Donc nous avons réalisé cette étude dans des étangs semi fermés situés à côté de la Mer Méditerranée ; ces étangs correspondent à des écotones, ou zones de transition, soumis à l'influence de la Méditerranée, de certaines arrivées d'eau douces [6] et à une forte influence anthropique. On va comparer les données obtenues de trois étangs : Salses-Leucate, Bages-Sigean et Gruissan. Le premier maintient des conditions relativement stables pendant la période d'étude, le deuxième présente de grandes oscillations pour la chlorophylle a (Chl a) et le troisième présente de grandes oscillations pour la salinité. On a choisi Salses-Leucate comme contrôle puisqu'il maintient des conditions environnementales stables, et on peut étudier les variations saisonnières d'un cycle viral sur l'autre, indépendamment de possibles conditions de stress qui pourraient arriver à Bages-Sigean et Gruissan. Dans Bages-Sigean, on peut explorer les relations entre des grandes variations de la Chl a, indicateur de présence de phytoplancton et de production primaire, et la lysogénie. Finalement, dans Gruissan on peut trouver des grandes variations de salinité, ce qui nous permet d'étudier la relation entre la lysogénie et un facteur de stress bactérien [6]. Nous avons suivi les variations de nombreux facteurs physicochimiques, comme le pH, la concentration de nutriments (TP-TN), la concentration de chlorophylle a, la concentration de O<sub>2</sub>, la température, et de facteurs biologiques comme les abondances bactérienne et virale, la fréquence de bactéries lysogéniques et certains paramètres physiologiques bactériens.

## Matériels et méthodes

### Échantillonnage

Pour réaliser cette étude nous allons suivre les différentes variables de février 2008 à février 2009 et j'ai pris part à ce projet durant 5 mois, de février à juin. Les échantillonnages ont eu lieu toutes les trois semaines à partir du 22 de février et les prélèvements ont été pris de la surface en triplicats. Les échantillons proviennent de 3 étangs avec différentes caractéristiques spécifiques [6].

Étang	Date	pH	T° (°C)	O <sub>2</sub> (% sat)	Salinité(TDS)	Chl a (ug/L)
Salses-Leucate	21/02/2008	8,12	11,2	74,2	31,8	0,873
	12/03/2008	8,17	10,6	117	33,5	1,405
	31/03/2008	8,23	12	168	34,4	0,93
	22/04/2008	8,18	13,9	76,3	33,9	0,86
	14/05/2008	8,44	20	83,6	33,9	0,7
Bages-Sigean	21/02/2008	8,35	11,3	94	31,3	1,443
	12/03/2008	8,13	11,6	192,5	32,5	5
	31/03/2008	8,34	10,5	163	34,8	4,14
	22/04/2008	8,45	13,3	80,2	32,6	5,25
	14/05/2008	8,55	19,8	56,6	33,7	10,72
Gruissan	21/02/2008	8,28	14,3	122,1	23,8	1,39
	12/03/2008	8,13	12,9	190,6	32,7	15,495
	31/03/2008	8,22	11,6	162,2	36,8	3,7
	22/04/2008	8,21	13,5	83,3	31,7	6,82
	14/05/2008	8,57	21,6	99,6	26,1	17,3

Tableau 1 : résumé des données environnementales et physico-chimiques pour chaque étang à chaque sortie.

### Variables environnementales

Les facteurs physicochimiques ont été étudiés *in situ* de manière continue pendant toute la période d'échantillonnage avec une sonde multiparamètre (Multi 350 i set MPP-25). Ces facteurs sont le pH, la température, la concentration d'oxygène et la salinité.

### Chlorophylle a

La Chl a a été déterminé par un spectrophotomètre Perkin Calmer 1550B. 50 millilitres d'échantillon ont été filtrés sur des filtres GFF préalablement carbonisés (450 °C ; 4h), avant d'être analysés par la méthode d'extraction à l'acétone selon le protocole de Li et al [10].

### Abondance et physiologie bactérienne

L'abondance et la physiologie bactérienne ont été réalisées par cytométrie en flux avec un instrument FACScalibur (Becton Dickinson)

Le comptage des diverses populations bactériennes est fait par rapport à un référentiel constitué de billes fluorescentes de 1µm (Molecular Probe), dont la concentration est déterminée à chaque analyse. L'abondance totale bactérienne a été déterminée après marquage au SybrGreen [12], (Molecular Probe, concentration finale 5µM, 15min. au noir), colorant des acides nucléiques (ADN ou ARN). Ce marqueur physiologique nous permet aussi de discriminer les populations bactériennes HNA et LNA [9]. Les bactéries avec une membrane altérée ont été mises en évidence après marquage à l'aide du kit « Backlight » (Molecular Probe, concentration finale 10µM, 15min. au noir) kit qui contient deux fluorochromes différents: le Syto 9 (vert) qui marque les acides nucléiques de toutes les bactéries, et l'iodide de propidium ou PI (rouge) qui pénètre uniquement dans les cellules avec une membrane trouée. Les bactéries à membrane altérée

(rouge) sont donc distinguées des autres bactéries dites « vivantes » (verte) par cytométrie en flux [9]. Pour détecter l'activité respiratoire bactérienne on a utilisé le 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium chloride (CTC)(Molecular probe, concentration finale 10 $\mu$ M). Le CTC est réduit par la chaîne transporteuse d'électrons en un composé insoluble (rouge fluorescent) et l'on peut ainsi quantifier l'activité métabolique bactérienne dans des conditions aérobies. [9]. La proportion de cellules avec une membrane dépolarisée a été évaluée par l'emploi du marqueur DiBAC (Molecular Probe concentration finale 1 $\mu$ g.ml-1), un anion lipophile activement exclu des cellules intactes, mais qui s'accumule à l'intérieur des cellules qui ont perdu leurs polarités membranaire et qui fluorescent en vert [14]. Pour détecter un état physiologique bactérien altéré, on a aussi utilisé le marqueur Topro (Molecular Probe ; concentration finale 10 $\mu$ M), en suivant le protocole de Li et al [9].

#### Abondance virale par Microscopie à Epifluorescence (EFM)

L'abondance virale a été caractérisée par microscope à épifluorescence (EFM) selon le protocole de Bettarel et al. [3], 250 $\mu$ l d'échantillon fixé (formol, concentration finale 1%) ont été filtrés sur un filtre de 0.02 $\mu$ m (Nanodisc whatman), puis colorés dans 30 $\mu$ l de Sybr-Gold (Molecular Probe) à une concentration finale 2.5X pendant 15 min au noir. Les filtres sont rincés avec un tampon Tris-EDTA (pH7.5), a fin d'éliminer l'excès de colorant. Les filtres sont observés avec un microscope à épifluorescence (Olympus Ax70) au grossissement x1250, sous une lumière bleue. Un minimum de 300 particules virales par filtre a été dénombré.

#### Interactions entre Bactéries et virus:

La lysogénie a été caractérisée par la fréquence de cellules lysogéniques (FLC). Pour obtenir ces données, on a fait des incubations avec la mitomycine C (Sigma, concentration finale 1 $\mu$ g.ml-1) pendant 17heures. La mitomycine C est un inducteur artificiel du cycle lytique, et nous avons déterminé l'abondance virale et bactérienne à différents temps d'incubation T0, T6, T8 et T17. Les abondances virales et bactériennes ont été obtenues au moyen des procédures précédemment expliquées. Ces abondances sont nécessaires pour obtenir la fréquence de cellules lysogéniques (FLC). L'induction du prophage a été définie comme la différence entre l'abondance virale traitée avec la mitomycine C (Vmc) et les incubations contrôle (Vc) [21,22] selon la formule suivante :

$$FLC\% = 100 * [(Vmc - Vc) / (BSBt0)]$$

Avec BS= burst size et Bt0= abondance bactérienne au début de l'expérience. (Marcus G. Weinbauer, M. G., Brettar, I. and Höfle M. H., 2003)[3,5,22]. Le burst-size correspond au nombre de virus produits par bactérie lysée, et est défini comme :

$$BS = (Vmc - Vc) / (Bc - Bmc)$$

Avec (Vmc - Vc) = différence maximum d'abondance virale entre les incubations avec de la mitomycine C et les contrôles, Bc = abondance bactérienne dans les tubes contrôles et Bmc = abondance bactérienne dans les tubes contenant la mitomycine C, à chaque temps.

#### **Résultats :**

##### Conditions environnementales de chaque étang

Les conditions environnementales (température, salinité) et les conditions physico-chimiques (chlorophylle a, pH, % de saturation en oxygène) ont été regroupées pour chaque étang dans le tableau 1. Le pH varie de 8,12 à 8,57 ; la température de 10,5 à 21,6°C et la concentration en O2 varie de 56,6 à 192,5 % de saturation, avec Bages-Sigean qui présente le plus de variabilité pour ce dernier paramètre. La salinité varie de 23,8 à 36,8 (TDS) avec Gruissan qui présente plus de variabilité (13 unités TDS) ; et la chlorophylle a varie de 0,7 à 17,3 ug/l avec une variation importante dans Bages-Sigean et Gruissan (tableau 1) Les concentrations en Chla sont significativement plus faibles dans Salses-Leucate et plus importante dans Gruissan (Test oneway Anova p < 0,05), alors que les autres paramètres sont pas significativement différents entre chaque étang.

##### Dynamiques bactériennes et virales

Nous avons suivi les abondances bactériennes et virales dans les trois étangs, qui sont représentées dans la figure 2. De plus, nous avons calculé le ratio VBR (Virus/Bactérie), indicateur du nombre de virus par bactérie (figure 3). Nous observons une augmentation globale de l'abondance bactérienne, qui varie de 5,51E+05 cellules/ml à 9,45E+06 cellules/ml, mais chaque étang semble suivre un patron spécifique de croissance très différent (figure2). L'abondance virale présente un patron de variation similaire pour chaque étang et varie de 2,81E+07 particules/ml à 3,99E+8 particules/ml (figure 2), avec un grand épisode de mortalité virale visible à la quatrième sortie. Le VBR quant à lui varie de façon similaire dans chaque étang, avec une baisse générale dans le temps, passant de 8,76 à 238, 75 (figure3).

##### Pourcentage de bactéries lysogènes :

Pour déterminer le pourcentage de bactéries lysogènes, nous avons suivi les abondances bactériennes et virales à différents temps d'incubation (T0 ; T6 ; T8 ; T17). Il existe deux façons de calculer la fréquence de bactéries lysogènes (FLC) basées sur la mortalité bactérienne : l'une considère un burst-size standard (valeur obtenue avec un burst-size bibliographique de 24 [15], l'autre sur l'estimation du burst-size des incubations. Les valeurs obtenues dans les deux cas sont présentées dans le tableau 2, et ne sont pas corrélées entre elles ( $r^2 = 0,24$  ;  $p = 0,65$ ), bien qu'il existe une corrélation entre les deux valeurs calculées de FLC dans Bages-Sigean ( $r^2 = 0,9574$  ;  $p < 0,05$  ; figure 4). Comme on peut voir, il existe de grandes différences entre les valeurs de FLC obtenues par le burst size des incubations et le burst size bibliographique. Chaque étang présentant peut-être burst-size différent, la valeur standard bibliographique ne paraît pas adaptée dans notre étude. Il est donc préférable de travailler avec nos données obtenues par incubation. Ainsi, le % FLC obtenu par les valeurs de burst-size des incubations varie de 3,40 à 32, 82 pour Bages-Sigean, alors que Salses-Leucate et Gruissan ne présentent qu'une valeur de FLC.

	Date	%FLC	%FLC biblio
Salses	21/02/2008		
	12/03/2008		
	31/03/2008		
	22/04/2008	7,59	3,55
	14/05/2008		
Bages	21/02/2008		
	12/03/2008	32,82	76,88
	31/03/2008	3,40	0,49
	22/04/2008	12,95	3,17
	14/05/2008	14,60	22,92
Gruissan	21/02/2008		
	12/03/2008		
	31/03/2008	73,78	11,53
	22/04/2008		
	14/05/2008		

Tableau 2 : Valeurs de FLC estimées par les deux méthodes, pour chaque sortie et chaque étang

Physiologie bactérienne :

Pendant ces 4 mois nous avons suivi 5 marqueurs de l'état physiologique bactérien par cytométrie en flux : dans le tableau 3 j'ai mis toutes les valeurs obtenues par CTC indicateur de la respiration bactérienne, les valeurs du Dibac, indicateur de la polarité de membrane, Sybr-Green marqueur utilisé pour obtenir l'abondance bactérienne, Topro indicateur de l'activité bactérienne et Baclight indicateur de l'état de la membrane bactérienne. Nous avons transformé les valeurs obtenues en pourcentages par rapport à l'abondance bactérienne totale obtenue par Sybr-Green.

Pour le CTC, on peut voir que Gruissan et Salses-Leucate présentent une dynamique similaire avec un maximum de respiration au deuxième point ; par contre, Bages-Sigean présente une dynamique très différente puisque le maximum de respiration se trouve au troisième point (figure 5). Et c'est dans cet étang que se trouve la variation maximale de respiration, entre 7,08% et 27,70%.

Pour le ToPro, nous observons un patron très similaire entre chaque étang, qui présente le maximum d'activité à la troisième sortie, et les valeurs oscillent entre 0,41% dans Gruissan et 72,22% dans Salses (figure 5). Pour le Dibac, nous avons obtenu un graphique avec un patron de croissance très similaire pour les trois étangs avec un maximum au deuxième point (figure 5). Les niveaux de variation vont de 9,03 à 261,75. Finalement pour le Baclight, on peut trouver une tendance à l'augmentation des cellules vivantes, sauf pour Gruissan qui présente un patron plus proche d'une distribution normale, (figure 6). Les niveaux de variation pour les cellules 'live' vont de 26,32% à 77,90%. Pour les cellules 'dead' il existe une tendance globale à la diminution dans le temps. Nous pouvons trouver de grandes similitudes entre

Bages-Sigean et Gruissan ; cependant Salses-Leucate présente un patron très différent. Les valeurs de cellules 'dead' oscillent entre 7,93% et 23,74%. Et finalement, par marquage au Sybr Green, on a obtenu l'abondance bactérienne et le pourcentage de cellules HNA (High Nucleic Acid) et LNA (Low Nucleic Acid) (figure 7)

	Date	Salses	Bages	Gruissan
CTC %	31/03/2008	10,80	7,08	15,61
	22/04/2008	19,16	11,86	21,00
	14/05/2008	17,01	27,70	18,63
Dibac %	21/02/2008	50,70	39,49	50,46
	12/03/2008	92,32	79,81	261,75
	31/03/2008	14,40	16,38	21,27
	22/04/2008	10,58	9,03	14,64
	14/05/2008	14,42	40,76	29,09
Baclight %	21/02/2008	26,32	53,32	63,97
	12/03/2008	50,80	57,52	77,09
	31/03/2008	48,68	65,72	77,90
	22/04/2008	52,89	61,41	73,80
	14/05/2008	75,19	68,20	63,09
Topro %	21/02/2008	4,00	3,49	5,34
	12/03/2008	6,83	5,60	7,85
	31/03/2008	72,22	63,05	49,09
	22/04/2008	4,91	1,52	0,41
	14/05/2008	26,02	13,99	26,33
SybrGreen	21/02/2008	5,51E+05	9,34E+05	6,45E+05
Cellules/ml	12/03/2008	3,04E+06	3,41E+06	1,74E+06
Abondance	31/03/2008	2,07E+06	8,46E+06	6,14E+06
bactérienne	22/04/2008	2,11E+06	8,57E+06	5,24E+06
	14/05/2008	5,53E+06	9,45E+06	4,21E+06

Tableau 3 : valeurs de CTC, Dibac, Topro et baclight pour chaque étang en pourcentages et Sybr-Green en Cellules/ml

**Discussion**

Concernant les paramètres physicochimiques, nous n'obtenons aucune différence significative entre les trois étangs ; cependant, on a pu voir qu'il existe de grandes différences entre chaque étang concernant la dynamique bactérienne et la fréquence de cellules lysogéniques. Ainsi, nous allons étudier chaque étang indépendamment pour déterminer les facteurs qui peuvent influencer la nature des interactions entre virus et bactéries.

L'étang de Salses-LeucateDynamique générale :

Pour définir les caractéristiques générales de chaque étang, nous avons étudié les principales relations entre les différents facteurs abiotiques et biotiques. Dans l'étang de Salses-Leucates, le VBR est relié à deux facteurs différents. Tout d'abord, nous avons trouvé une **corrélation négative** très importante entre le VBR et la

salinité, ( $r^2 = 0.92$ ;  $p < 0.05$ ), on peut ainsi dire

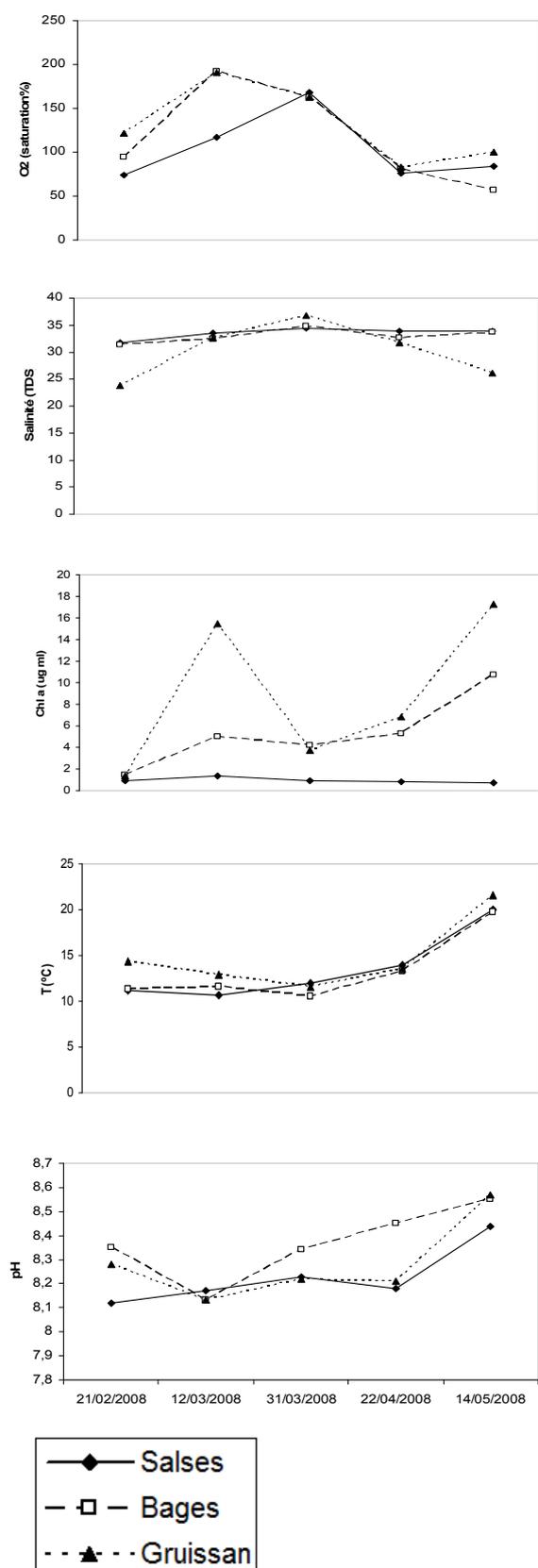


Figure 1: Suivi des conditions physicochimiques durant lors de ma participation à ce projet.

qu'avec une augmentation de la salinité le nombre de virus par bactérie diminue (figure 8). Ensuite, nous avons trouvé une corrélation négative entre le VBR et le % de cellules bactériennes CTC ( $r^2 = 0.99$ ;  $p < 0.05$ ); ainsi la diminution du nombre de virus par bactéries est corrélée avec l'augmentation de la respiration bactérienne (figure 9).

#### Dynamique du FLC

Pour Salses-Leucate, on a obtenu une seule valeur significative de FLC (tableau 2), donc nous ne pouvons pas faire de corrélations avec les autres paramètres. Cependant, cette valeur arrive à un moment particulier où nous trouvons les valeurs maximales de respiration bactérienne (figure 5) et de salinité (tableau 1), ainsi que la valeur minimale du VBR. Nous pouvons aussi voir qu'à cette date il y a une diminution importante de l'abondance virale sans diminution de l'abondance bactérienne (figure 2).

Selon Steward et al. [18], la lysogénie serait une stratégie de survie lorsque les conditions environnementales sont mauvaises ou stressantes pour les communautés bactériennes. Ainsi, nous proposons l'hypothèse suivante pour expliquer cette valeur importante de lysogénie enregistrée à cette date : Il y a un moment d'instabilité probablement causé par une entrée subite d'eau marine qui augmente la salinité, et cette situation de stress favorise la mise en place d'une interaction lysogénique permettant aux virus de survivre à des conditions adverses en s'introduisant dans l'intérieur des cellules hôtes [18]. Cette situation de stress se traduit chez les bactéries par une augmentation de la respiration, et donc une augmentation de cellules CTC (figure 5) Selon ce raisonnement, on explique aussi la valeur minimale du VBR, car il y aura moins de virus libres par bactéries dans le milieu, beaucoup d'entre eux étant rentrés en lysogénie. Enfin, la mise en place importante de la lysogénie à cette date là explique probablement le fait qu'on ne retrouve pas de corrélation entre les abondances bactériennes et virales dans cet étang. En effet, en excluant ces abondances lors de la sortie où il y a lysogénie, on retrouve une corrélation entre abondances bactériennes et virales dans cet étang (figure 10) Donc nous proposons que l'altération de cette corrélation soit influencée par la lysogénie et qu'elle est probablement due au fait que dans des conditions d'instabilité, les virus s'adaptent moins bien que les bactéries et leur proportion par rapport aux bactéries diminue.

#### L'étang de Bages-Sigean.

##### Dynamique générale :

Il existe une corrélation significative entre le % de bactéries CTC et la concentration en Chlorophylle *a* (figure 11,  $r^2 = 0.99$  et un  $p < 0.05$ ), ainsi qu'une autre corrélation entre le % de bactéries HNA et la concentration en Chlorophylle *a* ( $r^2 = 0.94$  et un  $p < 0.05$ ), ce qui indique que l'activité bactérienne est reliée à la production primaire dans cet étang. Donc nous pouvons en conclure que l'activité microbienne de l'étang de Bages-Sigean dépend principalement de l'activité du phytoplancton, mais les conclusions pour le CTC nécessitent d'autres données.

##### Dynamique du FLC :

Dans l'étang de Bages-Sigean, nous avons obtenu un patron de FLC avec 4 valeurs significatives (figure 12) qui suivent une tendance similaire à l'activité respiratoire (figure 11,  $r^2 = 0.98$ ), mais non significative. La plus grande valeur de pourcentage de FLC se trouve lors de la deuxième sortie, et coïncide avec le maximum de cellules qui ont perdu leur polarité membranaire (les cellules Dibac+) (figures 12 et 5), le maximum de cellules HNA et le minimum de cellules altérées (cellules PI+). Ces dynamiques indiquent que lorsque la majorité des cellules bactériennes ont perdu leur polarité membranaire, mais ne sont pas encore trop altérées, et ont encore une concentration en acides nucléiques importante, la lysogénie semble être favorisée. L'importante proportion de cellules HNA et une forte proportion de cellules lysogènes peut être un indicateur d'une inhibition de la lyse cellulaire.

Une autre valeur intéressante de FLC se trouve lors de la quatrième sortie, où nous observons une diminution subite de l'abondance virale mais l'abondance bactérienne reste égale (figure 5), ce qui cause une diminution du VBR et donc du nombre de virus libres par bactérie (figure 2). Physiologiquement, lors de cette sortie, nous avons trouvé un maximum de cellules altérées (PI+) (figure 5). Donc nous retrouvons le même patron de diminution de ratio et un indicatif physiologique de stress bactérien, justement dans un moment d'haute FLC. Ainsi cette FLC peut être due à la présence d'un facteur stressante, et la finalité est la survivance des virus.

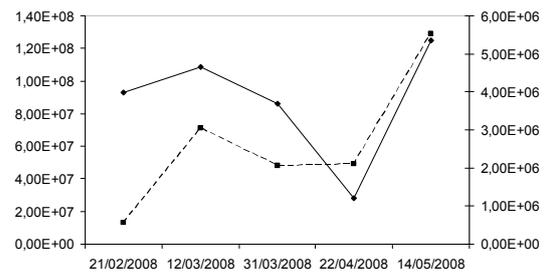
On a observé que la lysogénie est une stratégie importante pour Bages-Sigean, car détectée lors de la majorité des sorties, sans être le cycle dominant. Cependant, les variations des conditions environnementales en fonction de la FLC ne présentent aucun patron similaire. Nous pouvons conclure que dans l'étang de Bages-Sigean plusieurs facteurs environnementaux variables interviennent dans les variations de la FLC, avec probablement une grande importance de l'état physiologique bactérien. Cependant nous avons encore certaines données à traiter, et il faut continuer le suivi des différents facteurs pour arriver à des résultats concluants.

L'étang de Gruissan.

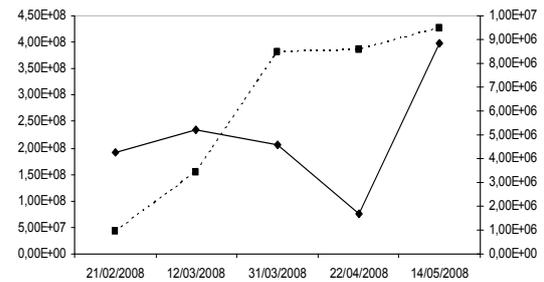
Dynamique générale :

Comme on a pu le vérifier, Gruissan est l'étang qui a le plus de Chlorophylle *a* (Oneway Anova,  $p = 0,05$ ) et nous avons donc étudié son influence sur la dynamique microbienne. Nous avons trouvé une forte corrélation négative entre la concentration de chlorophylle *a* et le pourcentage de cellules bactériennes altérées (PI+).  $r^2 = 0,88$  ;  $p < 0,05$ ). Ainsi, quand il y a augmentation de la concentration en chlorophylle *a*, les cellules bactériennes sont moins altérées. Une autre corrélation

A



B



C

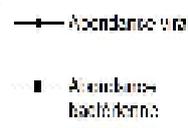
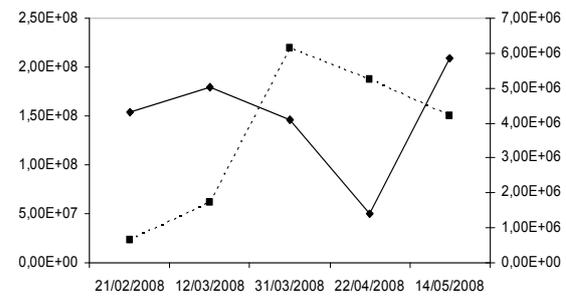


Figure 2 : dynamique de l'abondance virale et bactérienne pour Salses (A) pour Bages (B) et pour Gruissan (C), dans les graphiques on peut trouver à gauche l'abondance virale et à droite l'abondance bactérienne.

négative très importante est celle trouvée entre la concentration de chlorophylle *a* et le pourcentage de cellules HNA ( $r^2 = 0,93$  ;  $p < 0,05$ ). Ceci indique que dans cet étang la diminution de la concentration en chlorophylle *a* est synonyme d'augmentation du % de cellules HNA, indicateur de l'activité bactérienne. Nous pouvons donc dire que la concentration en chlorophylle *a* est un facteur important pour la physiologie bactérienne.

Dynamique du FLC :

Pour Gruissan, on a obtenu une seule valeur significative de FLC (tableau 2) donc nous ne pouvons pas faire de corrélations avec les autres paramètres, mais cette valeur arrive à un moment particulier où nous trouvons les valeurs maximales de cellules Topro (indicateur

d'altération de l'état physiologique

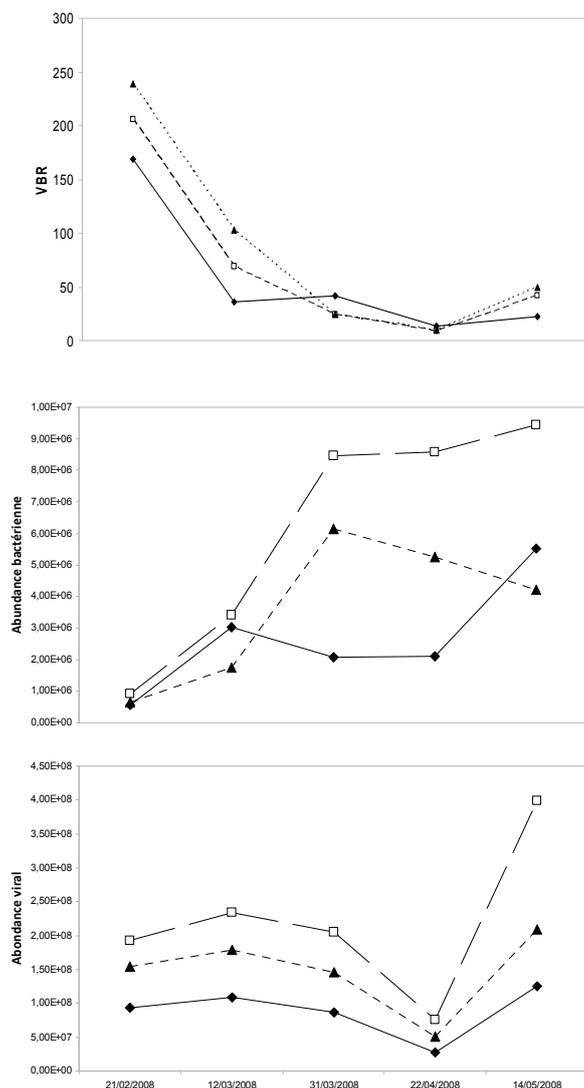


Figure 3 : Dynamique populationnelle pour les 3 étangs

bactérienne, figure 5), de salinité (figure 1) et d'abondance bactérienne (figure 3), ainsi que les valeurs minimales de température (figure 1), de la chlorophylle *a* (figure 1) et une diminution d'abondance virale (figure 3)

Selon ces résultats, l'hypothèse de lysogénie comme stratégie de survie [16] (Steward et al 1984) peut encore être appliquée ici. Je propose donc qu'il existe un moment d'instabilité causé par une entrée subite d'eau marine causant l'augmentation de la salinité et une diminution de la concentration de chlorophylle (figure 1). Ce changement osmotique produirait une situation de stress qui provoque une altération physiologique bactérienne, causant ainsi une augmentation de la proportion de cellules altérées (cellules TO-PRO+, 5), et donc favorisant la mise en place d'une interaction lysogénique entre les communautés bactériennes et virales. Cependant pour cet étang on n'a pas trouvé un

patron de dynamique populationnel similaire à Salses où le minimal VBR se produise justement dans le moment de FLC. (figure 3). Peut être que ces variations dans la dynamique populationnel de Gruissant, sont dues à l'influence du phytoplancton (Chl *a*) qui c'est très présente dans cet étang.

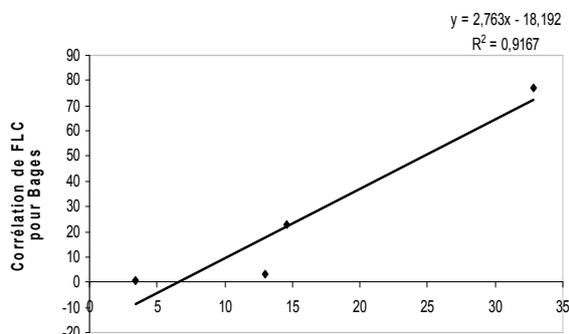


Figure 4 : graphique de corrélation entre le FLC bibliographique et FLC incubé.

**Conclusion :**

Nous avons trouvé que la lysogénie c'est un facteur très importante qui est intimement rattaché avec la dynamique des abondances microbiennes et avec variations environnementales produites d'une forme ponctuelle. Cependant ces rattachés ne présentent pas patrons similaires dans chaque étang étudié. Donc nous pouvons déduire que ils existent autres facteurs qui interviennent en la FLC et que varient dans chaque étang en l'attribuant caractéristiques spécifiques à chacun. Alors que il est nécessaire de continuer les études en étudiant plus de facteurs, comme par exemple la concentration de nutriments, ou la radiation ultraviolette ainsi on pourra définir mieux l'importance écologique de FLC.

**Bibliographie**

1. Ackerman, H.-W. and Dubow, M.S. Viruses of prokaryotes. In: General properties of bacteriophages, 1987. Vol.I. CRC Press, Boca Raton.202 p.
2. Béatrice, BEC.. These de la dynamique du picophytoplancton dans les lagunes méditerranéennes du Languedoc-Roussillon et de corse. 2005 Ecole doctorale Sciences écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.
3. Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Dolan J. Viral activity in two constraining lake ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70(5):2941-2951.
4. Curtis A. Suttle, Viruses in the sea. Nature 2005; 437: 356-361
5. Jepras RI, Carter J, Pearson SC, Paul FE, Wilkinson MJ. Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria. Appl Environ Microbiol. 1995; 61: 2696-2701.
6. Dauvin JC, Desroy N, Janson AL, Vallet C, Duhamel S. Recent changes in estuarine benthic and suprabenthic communities resulting from the

development of harbour infrastructure. *Mar Pollut Bull.* 2006;53:80-90.

7. Jiang, S. C., and J.H. Paul. Significance of Lysogeny in the Marine Environment: Studies with Isolates and a model of Lysogenic Phage Production. *Microb. Ecol.* 1997; 35 :235-243.
8. Jiang, S.C and J.H. Paul. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of Lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1994; 104: 163-172.

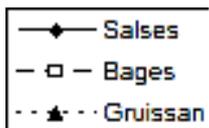
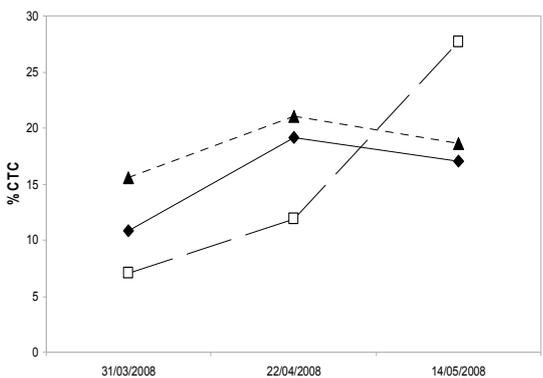
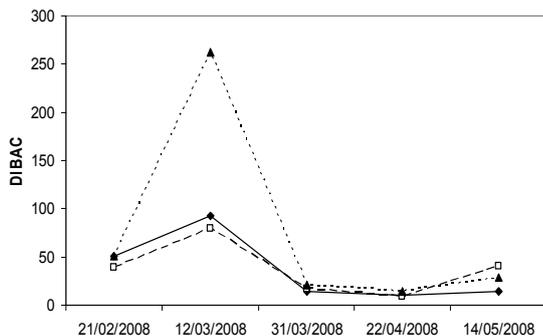
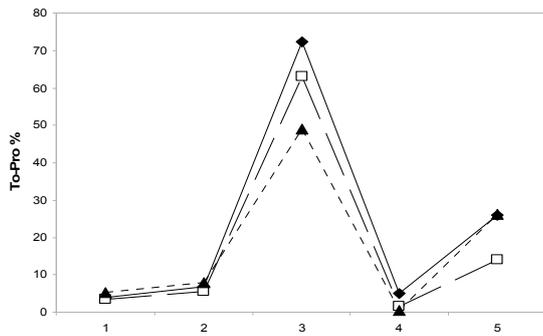


Figure 5 : physiologie bactérienne en pourcentage (ToPro, Dibac et CTC)

TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.* 1995; 40: 1485-1495.

11. Marcus G. Weinbauer, Ingrid Brettar, and Manfred G.Höfle *Limnol. Oceanogr.* 2003; 48: 1457-1465.

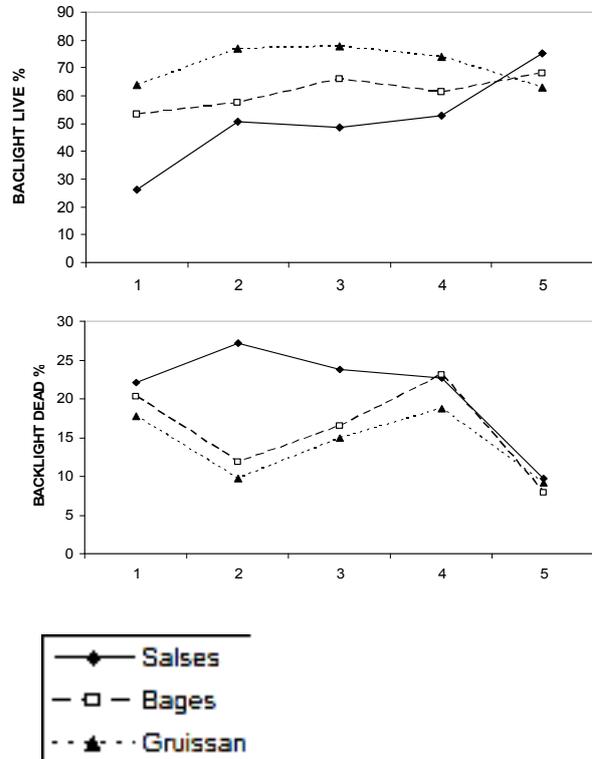


Figure 6 : Physiologie bactérienne en pourcentage, (Baclight)

12. Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaultot D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometer using de nucleic acid estain SYBR-GreenI. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63 : 186-193,
13. Middelboe, M., Riemann, L., Steward, G.F., Hansen, V. & Nybroe, O. Virus-induced transfer of organic carbon between marine bacteria in a model community. *Aquat. Microb. Ecol.* 2003; 33: 1-10
14. Novo DJ, Perlmutter NG, Hunt RH, Shapiro HM. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(4): 827-834.
15. Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, Gutiérrez R, Buendía-Clavería AM, Lei W, Margaret I, López-Baena FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Moreno J, Ruiz-Sainz JE. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and

Cajanus cajan. Mol Plant Microbe Interact. 2006; 19:43-52.

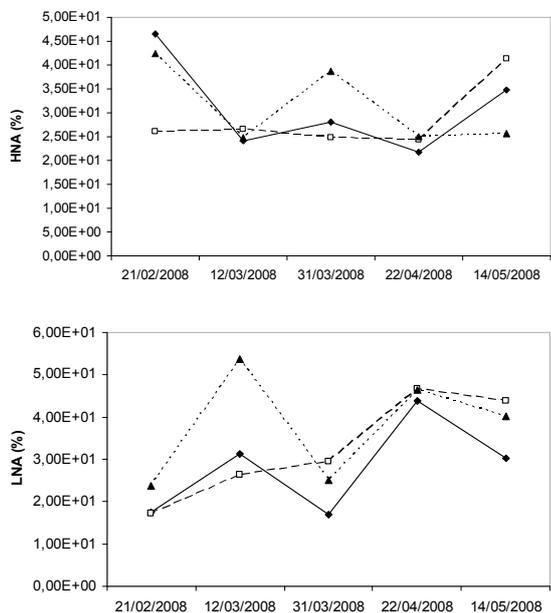


Figure 7 : pourcentage de HNA et LNA pour les trois étangs.

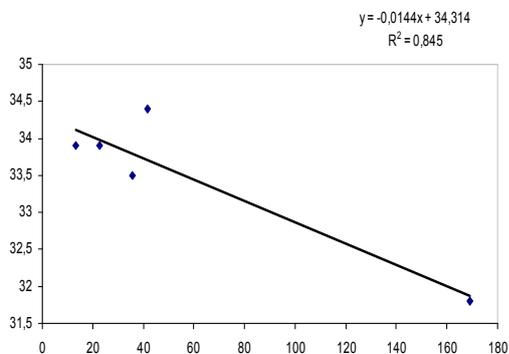


Figure 8 : Corrélation entre VBR et salinité.

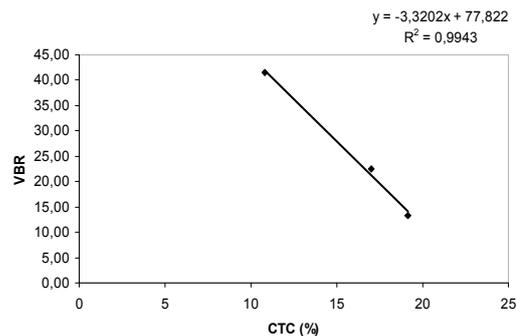
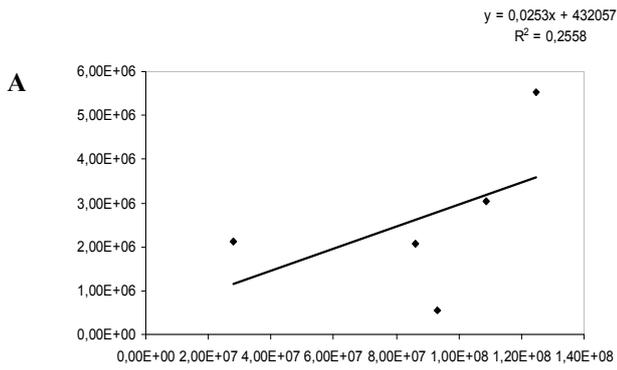
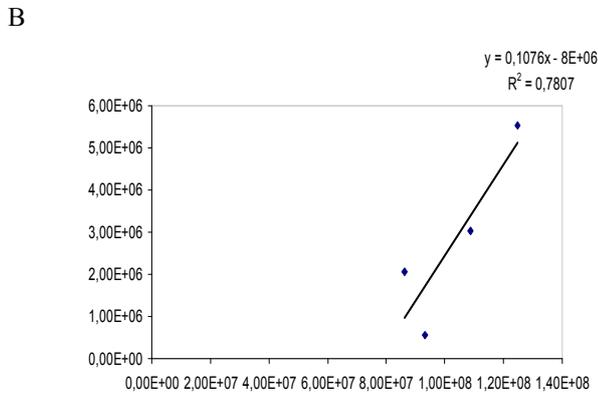


Figure 9 : Corrélation entre CTC et VBR

16. Personnic. S Les virus planctoniques: un compartiment biologique clé des milieux aquatiques Courrier de l'environnement de l'INRA 2006; 53: 19-33
17. Pomeroy LR. The oceans food web, a changing paradigm. BioScience 1974; 24: 499-504
18. Steward FM, Levin BR. The population biology of bacterial viruses: Why be temperature? Theor. Popul. Biol. 1984; 26: 93-117
19. Stopar D, Cerne A, Zigman M, Poljsak-Prijatelj M, Turk V. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. Microb.Ecol. 2003; 47:1-8
20. Suttle CA. Viruse in the sea. Nature 2005; 437: 356-361.
21. Weinbauer MA, Suttle CA. Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the gulf of Mexico. Appl.Environ.Microbiol. 1996; 62: 4374-4380.
22. Weinbauer MA, Hicks R E. Temperature virus and Lysogeny in Lake Superior bacterioplankton. Limnol.Oceanogr. 1998; 43: 95-103.
23. Wilhelm SW, Suttle CA. Viruses and nutrient cycles in the sea. Bioscience 1999; 49: 781-788
24. Wilkinson J. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. Appl. Environ.Microbiol. 1995; 61: 2696-2701



**ABONDANCE BACTÉRIENNE**



**ABONDANCE VIRALE**

Figure 10 : A correspond à la corrélation populationnelle entre virus et bactéries de Salses et B correspond à la corrélation entre virus et bactéries excepté le point où on a trouvé une FLC significative.

\*Direccion actual:

Instituto de Investigación y Ciencias, Puerto del Rosario, Fuerteventura. Islas Canarias. España.

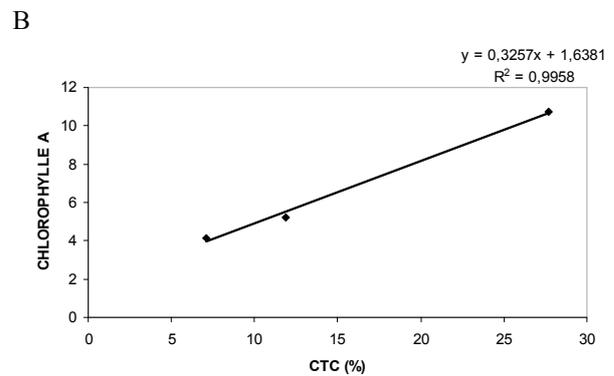
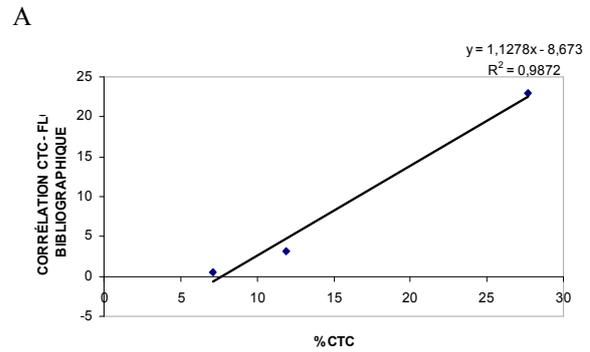


Figure 11 : A Corrélation LFC et chlorophylle a ; B corrélation chlorophylle a et CTC%

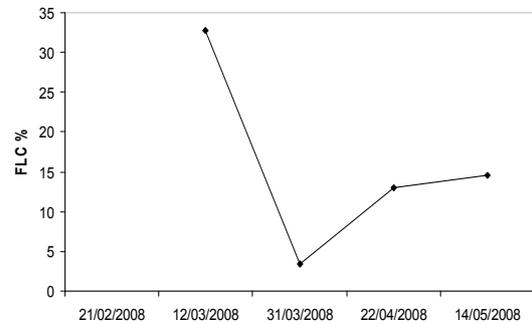


Figure 12 : Patron de variation de FLC.