

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA DISTRIBUTION DE LA COMPOSITION BACTÉRIENNE
SELON LEUR ÉTAT MÉTABOLIQUE
EN MILIEU D'EAU DOUCE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MARIE-NOËLLE BOIVIN

AVRIL 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Ce travail de maîtrise a été réalisé dans le domaine de l'écologie aquatique microbienne, domaine qui est encore assez nouveau et où il reste encore de nombreuses questions à répondre. De plus, avec les nouvelles technologies, ces questions deviennent plus faciles à cerner et le complexe de la boîte noire microbienne peut être maintenant adressé. Ce mémoire permettra donc de répondre à une question faisant partie de cette boîte microbienne, soit de caractériser la distribution de la composition bactérienne selon leur état métabolique en milieu d'eau douce. En définissant la composition et la distribution bactérienne, nous répondons à une grande question d'écologie aquatique microbienne soit : qu'est-ce qui compose l'habitat? En connaissant mieux les membres de la communauté, nous pourrons dans le futur répondre à plusieurs questions concernant leur milieu et les facteurs influençant les différentes bactéries.

Ce projet a deux principaux objectifs : 1) la mise au point du triage cellulaire pour séparer physiquement les bactéries entre elles et 2) la détermination de la distribution de la composition bactérienne selon leur état métabolique. Tout d'abord la combinaison du triage cellulaire et de la biologie moléculaire n'a été utilisée que récemment pour répondre à la question de la composition bactérienne en milieu aquatique. De plus, une majorité d'études ont été faites en milieu marin. Donc c'est pourquoi j'ai ciblé mon étude à des milieux aquatiques d'eau douce. Aussi, l'efficacité et la caractérisation du triage cellulaire ont peu été traitées dans les articles scientifiques. C'est donc pourquoi je consacre un chapitre de ce mémoire à la caractérisation et l'efficacité du triage cellulaire pour les bactéries de milieux aquatiques.

Les principales limitations de ce projet concernent les deux nouvelles techniques utilisées. Premièrement, pour le triage cellulaire, la principale limitation est l'efficacité de séparer physiquement les bactéries. Une deuxième limitation est la propreté de l'instrument. En effet, si l'instrument contient des bactéries autres que

celles étudiées, cela pourra contaminer l'échantillon. Deuxièmement, pour la biologie moléculaire, il existe plusieurs limitations. Il y a le risque de contaminer avec les bactéries du milieu environnant, la quantité faible d'ADN avec laquelle le travail est effectué et la sensibilité des essais moléculaires.

Enfin, j'aimerais remercier, premièrement, mon directeur Dr. Paul del Giorgio de l'Université du Québec à Montréal pour m'avoir soutenue, encouragée et dirigée tout au long de ce projet de maîtrise, deuxièmement, Eva Lindström, étudiante au post-doctorat du GRIL (Groupe de Recherche Interuniversitaire en Limnologie), qui m'a énormément aidée à établir les protocoles pour la biologie moléculaire, Leigh McCallister, étudiante au post-doctorat du GRIL, qui m'a soutenue moralement et répondu à mes nombreuses questions et finalement, Maria Lorena Longhi, étudiante au doctorat, qui a lu et donné ses commentaires pour des corrections en vue d'améliorer ce travail et qui a apporté son aide pour les statistiques.

TABLE DES MATIÈRES

Avant-propos	ii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Résumé	x
A. Introduction	1
1.Importance des bactéries	1
2.État métabolique du bactérioplancton	2
3.Triage cellulaire	4
4.Composition bactérienne	6
5.Triage cellulaire et biologie moléculaire	10
6.Problématique	12
B. Développement	13
Chapitre 1 : Caractérisation et efficacité du triage cellulaire	13
Chapitre 2 : Distribution de la composition bactérienne selon leur état métabolique sous forme d'article scientifique	39
C. Conclusion	70
Annexe I	71
Références	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Comparaison entre les trois modes de triage cellulaire	19
Tableau 1.2	Moyenne de la pureté et de la récupération dans les triages de billes de 0.5µm et 1 µm et 0.2, 0.5 et 1 µm	29
Tableau 2.1	The sampled lakes and rivers and their trophic status	44
Tableau 2.2	Chemical and physical data from the lakes and the rivers	50
Tableau 2.3	Comparison of the purity of the live and dead cells in the bulk and the collected fractions live and dead for each lakes	51
Tableau 2.4	Mean number of bands for all the DGGE profile (sorted lake contained the four sorted fractions: live, dead, HNA and LNA)	59
Tableau 2.5	Diversity index of the lakes based on the DGGE profile (sorted lake contained the four sorted fractions: live, dead, HNA and LNA)	60

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1	Chaîne trophique microbienne	1
Figure 0.2	Principe de la cytométrie et de la biologie moléculaire	11
Figure 1.1	A) Le fonctionnement du cytomètre en flux et B) La taille (FSC – forward side scatter) et la granularité (SSC – side scatter) déterminées par la cytométrie en flux	15
Figure 1.2	Triage cellulaire avec un système de triage par commutation (switch sorter) A) Le principe du triage cellulaire B) La séparation entre HNA et LNA C) La séparation entre cellules vivantes et endommagées)	17- 18
Figure 1.3	Réplication des comptages bactériens fait par la microscopie à épifluorescence sur le liquide de dilution utilisé lors du triage d'un lac (Fraser) et son entrée (Inlet Fraser)	25
Figure 1.4	Réplication des comptages à la microscopie à épifluorescence des deux échantillons d'eau brute soit d'un lac (Fraser) et de son entrée (Inlet Fraser) colorés au BacLight	26
Figure 1.5	Comparaison des réplifications des comptages bactériens à la microscopie à épifluorescence pour des échantillons triés et colorés au BacLight d'un lac (Fraser) et de son entrée (Inlet Fraser)	27
Figure 1.6	Comparaison entre les comptages bactériens du cytomètre en flux et de la microscopie à épifluorescence (Total (BacLight) et Syto pour cytométrie en flux et total M (BacLight) et Syto M pour comptage au microscope à épifluorescence)	28
Figure 1.7	Différents facteurs d'enrichissement obtenus lors de triage de billes fluorescentes de 0.5 et 1 µm avec les trois modes de triage disponibles	30

Figure 1.8	Différents facteurs d'enrichissement obtenus lors de triage de billes fluorescentes de 0.2, 0.5 et 1 μm avec les trois modes de triage disponibles	31
Figure 1.9	Comparaison entre les différents facteurs d'enrichissement de la partie collectée et de la partie se retrouvant dans le réservoir à déchets de divers mélanges se retrouvant à des complexités différentes	32
Figure 2.1	Lakes and rivers studied in Estrie (Brome is not illustrated)	43
Figure 2.2	Cytogram of a freshwater sample (lake Fraser) stain with a) Syto 13 and b) BacLight	45
Figure 2.3	The diversity index (H)	49
Figure 2.4	The Sorensen's index	49
Figure 2.5	Mean enrichment factor for cell sorting of freshwater samples (sorting for live and dead cells)	51
Figure 2.6	Control samples of the DNA extraction and PCR reaction	52
Figure 2.7	Cluster analysis of the control of the DNA extraction and the PCR reaction	53
Figure 2.8	Control samples of the replication of DGGE	53
Figure 2.9	Cluster analysis of the control of the DGGE replication	54
Figure 2.10	Bulk water samples form different lakes	55
Figure 2.11	Cluster analysis for the bluk sample of all lakes	56
Figure 2.12	Lake Bowker and its sorted fractions	56
Figure 2.13	Cluster analysis of the lake Bowker and its sorted fractions	57
Figure 2.14	Comparison between the different fractions collect live from the different sample lakes	57
Figure 2.15	Cluster analysis of all the fractions from the collect live of all the lakes	58

Figure 2.16	Mean and standard deviation of the diversity of each sorted fraction from all lakes (i.e. the collected dead contained all the lakes that we had profiles and they all came from different DGGE)	61
Figure 2.17	Mean and standard deviation for the diversity of the collected fractions (in a same gel, i.e. all the collected live or dead or HNA or LNA were put in the same DGGE profile) and the bulk	61
Figure 2.18	Mean and standard deviation of the Sorensen index (similarity value) for the sorted fractions for each lakes by looking at the presence and absence of the bands	62
Figure 2.19	Mean and standard deviation on the similarity for each group of sorted fractions from all lakes according to the relative intensity of each bands	63
Figure a.1	Lake Bran-De-Scie and its sorted fractions	71
Figure a.2	Cluster analysis of the lake Bran-de-Scie and its sorted fractions	71
Figure a.3	Lake Brome and its sorted fractions	72
Figure a.4	Cluster analysis of the lake Brome and its sorted fractions	72
Figure a.5	Lake Simoneau and its sorted fractions	73
Figure a.6	Cluster analysis of the lake Simoneau and its sorted fractions	73
Figure a.7	In Fraser and its sorted fractions	74
Figure a.8	Cluster analysis of the In Fraser and its sorted fractions	74
Figure a.9	In Bran-de-Scie and its sorted fractions	75
Figure a.10	Cluster analysis of the In Bran-de-Scie and its sorted fractions	75
Figure a.11	Lake Fraser and its sorted fractions	76
Figure a.12	Cluster analysis of the lake Fraser and its sorted fractions	76
Figure a.13	Lake Des Monts and its sorted fractions	77
Figure a.14	Cluster analysis of the lake Des Monts and its sorted fractions	77
Figure a.15	Lake Stukely and its sorted fractions	78

Figure a.16	Cluster analysis of the lake Stukely and its sorted fractions	78
Figure a.17	Comparison between the different fractions collect dead from the different sample lakes	79
Figure a.18	Cluster analysis of all the fractions from the collect dead of all the lakes	79
Figure a.19	Comparison between the different fractions collect HNA from the different sample lakes	80
Figure a.20	Cluster analysis of all the fractions from the collect HNA of all the lakes	80
Figure a.21	Comparison between the different fractions collect LNA from the different sample lakes	81
Figure a.22	Cluster analysis of all the fractions from the collect LNA of all the lakes	81

RÉSUMÉ

Les bactéries jouent un rôle important dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique et sont les joueurs clés de la boucle microbienne et du cycle du carbone. Le bactérioplancton est très abondant dans les lacs et les rivières et les récentes découvertes en biologie moléculaire ont démontré que ces communautés sont très diverses. Une question primordiale dans le domaine de l'écologie microbienne est comment la diversité de ces microorganismes est connectée à leur capacité métabolique et à leur activité dans l'environnement.

Dans une communauté bactérienne, ce ne sont pas toutes les bactéries qui sont actives également et il y a une gamme continue d'activités des cellules mortes aux cellules hautement actives. Il est encore imprécis de dire que les différents états physiologiques sont associés à des taxa spécifiques ou si l'activité est distribuée de façon homogène à travers tous les taxa. Cette étude explore la connexion entre les états physiologiques et la composition taxonomique dans les communautés bactériennes de lacs.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les cellules avec un contenu élevé et bas d'acides nucléiques et les cellules avec une membrane intacte ou endommagée. Dans le premier cas, le colorant nucléaire Syto 13 permettra de différencier les cellules à haut et bas taux d'acides nucléiques. Pour l'intégrité des membranes cellulaires, celles-ci seront étudiées avec Baclight, un produit composé de deux colorants.

Nous avons analysé les fractions en utilisant la cytométrie en flux et le triage cellulaire pour séparer physiquement les fractions bactériennes. Les échantillons ont été ensuite concentrés et l'ADN résultant a été extrait, amplifié et analysé en utilisant la DGGE. Les résultats montrent qu'il y a une différence entre la composition taxonomique et les différents états physiologiques, i.e. ce ne sont pas les mêmes espèces que l'on retrouve entre les cellules avec une membrane intacte et endommagée et entre les bactéries à haut taux ou bas taux d'acides nucléiques. Ces différences sont observées par la présence ou l'absence de bandes (DGGE) et plus souvent dans l'intensité des bandes. Ces résultats tentent de montrer qu'une connexion existe entre les états physiologiques et la composition taxonomique des communautés bactériennes, ce qui pourrait avoir des implications au niveau du fonctionnement et de la régulation de ces communautés.

Mots clés :

Triage cellulaire, composition bactérienne, lacs, état physiologique, DGGE, bactérioplancton

INTRODUCTION

1. Importance des bactéries

Dans les écosystèmes aquatiques, les bactéries occupent une grande place au niveau des communautés planctoniques, tant par leur grand nombre que par leurs différents rôles. Un premier rôle joué par les bactéries est celui de leur participation à la chaîne trophique microbienne (fig.0.1), c'est-à-dire qu'elles utilisent et décomposent la matière organique présente dans les milieux aquatiques en la minéralisant ce qui transforme la matière organique dissoute en biomasse microbienne, tout en transformant une partie de cette matière organique en CO_2 respiré (Bianchi *et al.* 2003). Deuxièmement, les bactéries participent au cycle biogéochimique en relâchant des nutriments inorganiques (Jaspers *et al.* 2001). Finalement, elles participent à la respiration et donc influencent le carbone présent dans le milieu (Smith 1998; Gonzalez *et al.* 2003).

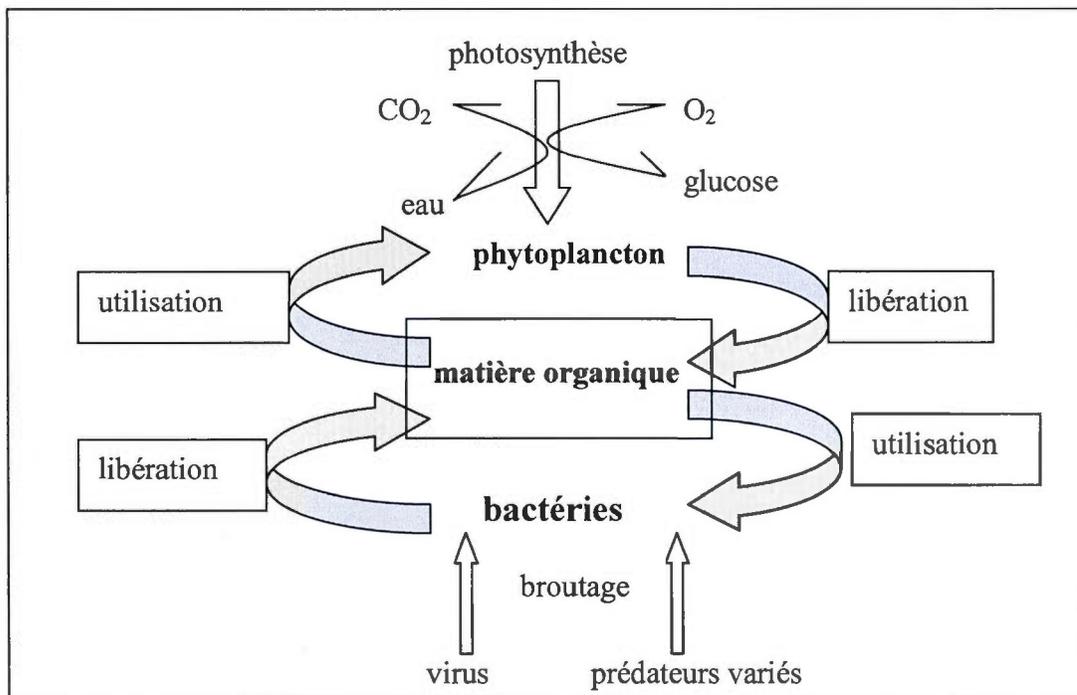


Fig. 0.1 Chaîne trophique microbienne

Plusieurs facteurs environnementaux et biologiques influencent les bactéries en terme de croissance, d'activité et de composition. Il existe plusieurs facteurs physico-chimiques dont, la présence de la matière organique pour la transformer en biomasse (Bianchi *et al.* 2003). La photolyse induite par la fréquence des ultra-violets influencent l'augmentation ou la diminution de la matière organique dissoute et si la matière organique dissoute augmente, l'activité microbienne augmentera (Scully *et al.* 2003) et les ultra-violets peuvent, en plus, endommager les bactéries au niveau de leur ADN et donc affecter la composition de la communauté (Maranger *et al.* 2002). De plus, certains nutriments, plus particulièrement l'azote et le phosphore, limitent la croissance des bactéries hétérotrophes car plus il y aura d'azote et de phosphore de disponibles, plus la croissance bactérienne augmentera (Felip *et al.* 1996; Vadstein *et al.* 2003). De plus, une température plus élevée cause une augmentation du métabolisme des bactéries et une température plus basse cause un ralentissement du métabolisme des bactéries (Felip *et al.* 1996; Addy et Green, 1997). Pour les facteurs biologiques, on retrouve les prédateurs, comme le zooplancton, les flagellés et les ciliés, ainsi que les virus. La prédation par les protozoaires influence les communautés bactériennes ou certaines espèces en particulier au niveau de la taxonomie, de la structure morphologique et de l'état physiologique (Hahn et Höfle, 2001). Les virus jouent aussi un rôle dans le contrôle des bactéries car ceux-ci causent la mortalité des populations hôtes et ils agissent aussi comme mécanisme en diversifiant la génétique des hôtes (Alonso *et al.* 2001).

2. État métabolique du bactérioplancton

Une des principales questions en écologie microbienne est de savoir quelles espèces participent à l'activité et la productivité totale du milieu. Deux des critères pour juger l'état métabolique sont le taux de croissance et la taille des bactéries (Bernard *et al.* 2000). Ces critères ne sont pas reliés à un modèle linéaire, mais plutôt à une relation en forme de cloche, ce qui implique qu'il y a une grande variété dans l'activité des bactéries (Bernard *et al.* 2000) et donc, une gamme continue d'activités

dans une communauté (Smith et del Giorgio, 2003). Malgré cette continuité et pour faciliter les études, les bactéries d'une communauté peuvent être regroupées en trois principales catégories : les bactéries actives et viables qui jouent un rôle dans la production de biomasse, les bactéries viables et inactives qui peuvent jouer un rôle dans l'avenir et finalement les cellules mortes qui ne sont pas actives et qui sont prêtes à être décomposées (Bernard *et al.* 2001). Comme par exemple, il semblerait qu'avec l'utilisation du CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium, un indicateur du transport actif des électrons) on détecte généralement moins de 20% de cellules qui respirent et qui sont actives par rapport à la communauté totale (Bernard *et al.*, 2000 ; Smith et del Giorgio, 2003).

Pour cette étude, dont le but est de déterminer s'il y a une différence dans la répartition de la composition bactérienne selon leur niveau métabolique, les bactéries seront divisées en deux principaux groupes d'activités: les bactéries actives (HNA) versus inactives (LNA) et les bactéries dont la membrane n'est pas endommagée (live) versus une membrane endommagée (dead). Donc, une partie de la gamme de l'activité bactérienne sera déduite à l'aide de la cytométrie en flux et des colorants Syto 13 et BacLight. Le Syto 13, qui colore les acides nucléiques, permet d'identifier deux types de bactéries: il s'agit des HNA (haute teneur en acides nucléiques, la fluorescence verte plus élevée) et des LNA (faible teneur en acides nucléiques, la fluorescence verte plus faible). Chaque catégorie est représentée par quelques caractéristiques. Premièrement, les HNA semblent avoir une contribution se situant entre 77% et 100% de la production bactérienne totale, tout dépendant des milieux, et les LNA contribuent en moyenne entre 5 et 20% de la production bactérienne (Lebaron *et al.* 2001; Zubkov *et al.* 2001; Servais *et al.* 2003). Donc, les HNA sembleraient participer à la plus grande partie de la transformation de la matière en biomasse. Les bactéries contenant un haut taux d'acides nucléiques (HNA) sont considérées comme étant les plus actives. Donc, les HNA considérés comme étant les membres dynamiques de la communauté bactérienne aquatique, ont une croissance plus rapide. Les HNA sont des cellules intactes et peuvent contenir des

virus, des copies multiples de virus, des plasmides, un haut taux d'ARN et des copies multiples de génome tandis que les LNA sont des bactéries inactives, dormantes ou mortes car leur ADN peut être plus ou moins dégradé et la membrane peut aussi être endommagée et ces cellules ne répondent pas aux changements environnementaux (Bernard *et al.* 2000; Lebaron *et al.* 2001; Zubkov *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002).

Le produit Baclight est utilisé avec la cytométrie en flux pour étudier l'intégrité de la membrane. Ce produit est composé du colorant Syto 9 et d'iodide de propidium. Le Syto 9 a une fluorescence verte et colore les acides nucléiques. Ce colorant marque les bactéries intactes et endommagées car il est perméable. L'iodide propidium, quant à lui, a une fluorescence de couleur rouge-orange. Ce colorant est imperméable pour la membrane donc la coloration se fera seulement au niveau des acides nucléiques des bactéries qui ont la membrane endommagée (Hoefel *et al.* 2003). Sous une lumière bleue, les bactéries colorées apparaîtront vertes si leur membrane est intacte et rouges si la membrane est endommagée (Decamp et Rajendran, 1998). Donc le produit Baclight nous permet de diviser les bactéries en deux populations soient les cellules vivantes (membranes intactes) et les cellules mortes (membranes endommagées). Le produit Baclight comporte plusieurs avantages dont sa fiabilité et sa rapidité (Decamp et Rajendran, 1998). Aussi, les bactéries colorées au Baclight sont faciles à dénombrer dû au fait qu'il y a un contraste élevé entre les cellules vertes et rouges (Boulas *et al.* 1999).

3. Triage cellulaire

Pour séparer les différents états métaboliques, le triage cellulaire à l'aide du cytomètre en flux va être utilisé. La cytométrie en flux permet d'étudier différents paramètres soient l'abondance, la taille des cellules et les caractéristiques biochimiques d'une population bactérienne (Fuchs *et al.* 2000; Vives-Rego *et al.* 2000). Pour déterminer l'abondance bactérienne trois méthodes sont disponibles avec la cytométrie en flux. Premièrement, il y a la méthode du volume fixe qui permet de mesurer le volume par deux électrodes ou des senseurs optiques qui déterminent la

position de l'échantillon dans le tube capillaire. Le comptage des cellules est initié quand l'échantillon passe devant le premier senseur et terminé quand il passe devant le deuxième senseur, ce qui donne un compte par unité de volume. Cette méthode est une quantification directe des microorganismes. La deuxième méthode est basée sur l'intégration du temps. Pour cette méthode, on assume un flux constant d'échantillon pendant un certain temps en utilisant une seringue ou une pompe pour délivrer le volume d'échantillon nécessaire. Finalement, il existe une méthode de quantification indirecte, la méthode la plus simple et précise, ici utilisée. Il s'agit du comptage radiométrique. Cette méthode utilise le ratio entre les billes de référence fluorescentes dont la concentration est connue et la concentration inconnue des cellules (Nebe-von Caron *et al.* 2000; Vives-Rego *et al.* 2000).

De plus, la cytométrie en flux permet la séparation de différents types de cellules par le triage. Le triage consiste plus précisément à la séparation des fractions cellulaires basée sur une sélection pré-définie des propriétés cellulaires qui peuvent être mesurées ou estimées par la cytométrie en flux. Plusieurs traits peuvent être utilisés pour effectuer le triage cellulaire comme la diffusion de la lumière, les structures internes et l'intensité de la fluorescence des bactéries (Wallner *et al.*, 1997). Il y a trois principales méthodes pour séparer les cellules par le triage : le triage par destruction, le triage par goutte et le triage par commutation. Le triage par destruction consiste à détruire les cellules non cibles. Le triage en goutte dépose les cellules dans une goutte d'eau. Le triage par commutation consiste au changement mécanique des cellules présentes dans un flux liquide avec l'aide d'un bras mécanique (Vives-Rego *et al.*, 2000). Pour cette étude, l'analyse par cytométrie et triage cellulaire (trilage par commutation) sera faite pour séparer les cellules actives (HNA) des inactives (LNA) et pour séparer les cellules avec une membrane intacte (live) et une membrane endommagée (dead). Pour ce faire, nous avons utilisé deux produits, BacLight et Syto 13, décrits ci-haut.

4. Composition bactérienne

Les bactéries sont influencées par des facteurs environnementaux et physico-chimiques et elles participent à de nombreux processus dans le milieu aquatique. Pour connaître quelles bactéries participent à ces processus, il est très important de connaître la différence entre les cellules actives (participant à la production de la biomasse), viables (membrane et ADN intacts) et inactives (ne participant pas à la production de biomasse). Il est suggéré que la composition au niveau de la communauté inclut les cellules inactives et non viables (Bernard *et al.* 2001). En plus, les bactéries cultivables des écosystèmes aquatiques représentent 1% ou moins des bactéries totales. La nécessité de trouver d'autres moyens pour étudier ces variations génétiques, dues entre autre aux mutations ponctuelles chez les différents groupes de bactéries, est donc importante (Schloter *et al.* 2000; Rodriguez-Valera, 2004). Plusieurs de ces moyens font partie du domaine de la biologie moléculaire, comme l'extraction de l'ADN, la réaction en chaîne des polymérase (PCR) et le gel d'électrophorèse à gradient dénaturant (DGGE).

La réaction en chaîne des polymérase (PCR) est effectuée, dans cette étude, avec la molécule 16S rADN. Le 16S rADN est aussi appelé 16S ARN ribosomal (16S rARN) car il s'agit de son équivalent génétique (Kemp et Aller, 2004). Une similarité, en moyenne de 97%, existe dans les séquences du 16S rADN entre les bactéries, ce qui est un niveau raisonnable pour regrouper les bactéries en espèces (Hagström *et al.* 2002). Aussi ces rARN ont une distribution universelle, une variabilité modérée et un transfert génétique latéral minimal (Woese, 1987) ce qui permet l'utilisation de cette molécule pour la réaction en chaîne des polymérase. De plus, le 16S rADN est composé d'une séquence de nucléotides qui reflète l'histoire évolutive des microorganismes car cette séquence change dans le temps. Le 16S rADN peut donc être utilisé comme molécule qui permet l'identification d'un microorganisme car chaque séquence de 16S rRNA est unique pour chaque taxon (Lindström, 1998). Le PCR emploie des séquences d'oligonucléotides (Zehr and Voytek, 1999) et la polymérase d'ADN thermostable est utilisée pour amplifier les

séquences cibles d'ADN (MacGregor, 1999). Plus précisément, la réaction en chaîne des polymérase consiste à amplifier exponentiellement l'ADN d'un échantillon. Le PCR consiste à fusionner l'ADN passant de la double hélice à une simple bande. Ensuite les oligonucléotides se collent à l'ADN et celui-ci est ensuite amplifié à l'aide de la polymérase, ce qui résulte en une duplication de l'ADN de départ (Steffan et Atlas, 1991). L'approche rRNA a été utilisée avec succès lors d'études dans les milieux marins et d'eau douce.

Le gel d'électrophorèse à gradient dénaturant (DGGE) est effectué à la suite du PCR qui a permis d'amplifier l'ADN présent dans l'échantillon afin d'avoir une réponse lisible à la DGGE. La DGGE est utilisée pour avoir un aperçu de la structure des communautés bactériennes dans la nature. La DGGE consiste à la séparation des fragments d'ADN selon leur mobilité électrophorique (Muyzer, 1999). De plus, les fragments d'ADN de la même longueur, mais de séquences de nucléotides différentes peuvent être séparés. La séparation est faite sur soit un gradient linéaire de dénaturant d'ADN, fait d'urée et de formamide et ayant la polyacrylamide comme base ou soit dans un gradient linéaire de température. Quand le domaine de fusion, ayant la température de fusion la plus basse, atteint sa température, une transition a lieu. Cette transition se fait entre la molécule à hélice et la molécule partiellement fusionnée. Cette molécule sera pratiquement arrêtée dans le gel de DGGE. L'ADN est composé de domaines de fusion fait de longues séquences de paires de bases avec une température de fusion identique ou différente. En particulier, les paires de nucléotides AT ont une température de fusion plus basse que les paires GC. Aussi, l'ordre des paires GC et AT peut influencer la température de fusion (MacGregor, 1999; Kisand et Wikner, 2003). Donc, les variations dans les séquences des domaines de fusion existent et ces variations permettent l'existence de différentes températures de fusion. Ces différentes séquences sont arrêtées à différentes positions lorsque le gel est composé d'un gradient dénaturant (Muyzer *et al.* 1993). Ces différentes bandes reflètent alors les populations dominantes d'un milieu (Lindström, 1998). Dans les écosystèmes aquatiques, les domaines *Bacteria*,

Archaea, le phylum *Proteobacteria* et les sous-classes beta, alpha et gamma sont entre autres retrouvés (Glöckner *et al.* 1999). En utilisant cette approche, environ 50% de la variation dans la séquence est détectée dans les fragments d'ADN, jusqu'à 500 paires de base, mais ce pourcentage peut être augmenté jusqu'à 100% quand une séquence riche en GC est attachée au fragment. L'addition de GC agit comme un domaine de fusion élevé qui prévient la complète dissociation des deux bouts d'ADN en un seul fragment (Muyzer et Smalla, 1998; MacGregor, 1999; Kisand et Wikner, 2003).

Les techniques moléculaires ont des avantages et des désavantages. Plusieurs biais sont introduits au niveau de l'efficacité de l'extraction, la préservation moléculaire de l'ADN, l'hétérogénéité des espèces, la manipulation et la contamination de l'échantillon (Macgregor, 1999). Pendant la manipulation de l'échantillon, la conservation aérobie ou anaérobie ou le délai avant la congélation peuvent affecter la composition de la communauté échantillonnée. En plus des problèmes engendrés avec l'extraction de l'ADN, la fiabilité et la reproduction de la lyse des cellules bactériennes, l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques intacts et la suppression des substances qui peuvent inhiber l'amplification de la digestion de l'ADN, sont d'autres problèmes encourus (Muyzer et Smalla, 1998). Le PCR et la DGGE peuvent avoir une basse sensibilité quand leur application se fait sur des échantillons naturels à cause de la grande diversité de la composition présente dans un échantillon. Cette basse sensibilité peut être due à de faibles connaissances au sujet de la séquence des nucléotides, i.e. de nombreuses variétés de séquences existent dans une même communauté naturelle (Kisand et Wikner, 2003). Cela implique donc que les séquences connues ne peuvent pas toujours cibler toutes les espèces dans un échantillon naturel contrairement à des espèces cultivables qui ont une séquence de nucléotides déjà bien établie. Les espèces détectées sont donc en fait les espèces dominantes de la communauté et non toutes les espèces présentes. Quand les ARN sont utilisés, on doit prendre en considération que ceux-ci sont dégradés rapidement. De plus, le nombre de copies

du gène ARNr varient entre les taxa ce qui peut résulter dans une sur ou sous estimation de la représentation des espèces après une réaction de PCR tout dépendant du nombre de copies (MacGregor, 1999). Les différences dans l'efficacité de l'amplification entre taxa et la formation de molécules chimériques qui peuvent causer une sur ou sous estimation du nombre réel des constituants des communautés sont d'autres biais qui apparaissent lors du PCR (Muyzer et Smalla, 1998). L'utilisation des amorces universelles peut aussi être problématique. Les amorces universelles possèdent une séquence de nucléotides généraux ce qui implique qu'elles ne peuvent trouver les petites différences de nucléotides. Ces amorces universelles peuvent donner une idée inadéquate de la richesse présente dans un échantillon naturel parce que les amorces choisies ciblent les espèces dominantes, mais elles ne peuvent pas cibler toutes les espèces dans une même communauté (Muyzer et Smalla, 1998). Cela amène une sélection des amorces très prudente pour arriver à une bonne estimation de la communauté. De plus, les artéfacts, les molécules chimériques et les nucléotides erronés peuvent être produits durant le processus d'amplification lors du PCR. La basse résolution des produits peut être due à la présence de plusieurs domaines de fusion. Ces domaines de fusion causent des bandes floues sur un gel de DGGE. Ces domaines de fusion peuvent causer la représentation d'une seule espèce par des bandes multiples ou la représentation de plusieurs espèces par une seule bande. Donc, l'interprétation des profils de DGGE peut être très hasardeuse (Kisand et Wikner, 2003). La séparation des fragments peut être aussi une limitation surtout quand de grands fragments (plus de 500 paires de bases) sont présents (Muyzer et Smalla, 1998).

Même si plusieurs désavantages existent, l'approche moléculaire est encore utilisée à cause de ses avantages. L'approche moléculaire permet d'étudier la composition de la communauté sans les biais de la culture (MacGregor, 1999). Les techniques moléculaires sont faciles, reproductibles et fiables (Muyzer et Smalla, 1998). Les amorces, choisies correctement et selon l'échantillon de base, peuvent cibler des groupes phylogénétiques de la souche au niveau universel (MacGregor,

1999). Le PCR et la DGGE sont rapides et fiables pour la comparaison relative des différentes communautés (Kisand et Wikner, 2003). En utilisant la DGGE, plusieurs échantillons peuvent être passés en même temps. Ces caractéristiques font que ces outils moléculaires sont puissants pour étudier le comportement de la communauté, comme par exemple, après des changements environnementaux (Muyzer et Smalla, 1998).

L'utilisation de la biologie moléculaire a démontré qu'une différence dans la composition bactérienne entre les cellules de différentes tailles est observable et donc que ces cellules possèdent différentes activités (Bernard *et al.* 2001). Il y a aussi une différence dans la composition bactérienne entre la communauté totale et les cellules réduisant le colorant CTC (Bernard *et al.*, 2000). Le colorant CTC (5-cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride) sert à énumérer les bactéries qui sont actives et qui respirent. En effet, les bactéries réduisant le CTC sont considérées comme ayant un haut taux d'activité métabolique et les bactéries ne le réduisant pas ne sont pas actives ou ont un bas taux d'activité physiologique (Sherr *et al.* 1999).

5. Triage cellulaire et biologie moléculaire

La diversité génétique des procaryotes dépend du répertoire des gènes que chaque bactérie peut contenir (Rodriguez-Valera, 2004). Comme par exemple, lors d'une comparaison d'un profil de DGGE entre des bactéries d'un milieu marin qui répondent à un substrat et celles qui n'y répondent pas, la présence de mêmes bandes signifie que des bactéries viables et non viables composent cette communauté (Bernard *et al.* 2001). Cette similitude démontre que différents états physiologiques existent en même temps à travers une même population. De plus, il semblerait qu'une petite fraction des cellules totales est représentée par les cellules actives et, que seulement, si cette fraction est plus grande que 1%, il est alors possible de la détecter par la DGGE. Cela implique que ces cellules actives sont rapidement désactivées après leur phase de croissance (Bernard *et al.* 2001). Donc, pour être capable de détecter le maximum de différences dans la diversité bactérienne d'une

communauté, il faut donc étudier différents états métaboliques en combinant différentes techniques.

La combinaison du triage cellulaire et de la biologie moléculaire permettent de vérifier si une différence existe dans la composition bactérienne (fig 0.2). En effet, le triage cellulaire des échantillons environnementaux permet la sélection d'une certaine population faisant partie d'un ensemble plus complexe (Gallner *et al.* 1997). Plusieurs études utilisent cette technique selon un mode de triage « single-cell » (maximum de pureté, minimum de rendement) sans toutefois montrer avec certitude l'efficacité du triage cellulaire (Zubkov *et al.* 2001; Servais *et al.* 1999; Servais *et al.* 2001). C'est pourquoi une partie de ce travail traitera de l'efficacité du triage selon les modes de triage disponibles et la complexité du mélange à trier.

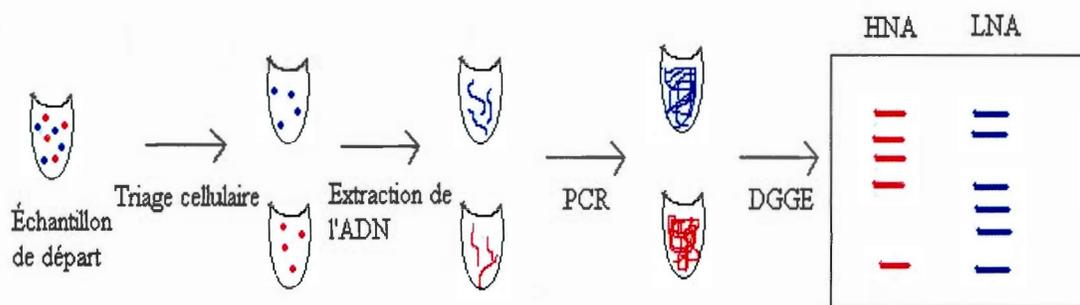


Fig. 0.2 Principe de la cytométrie et de la biologie moléculaire

En utilisant divers échantillons, marins, lacustres et de boues, la combinaison du triage cellulaire, du PCR et de la DGGE a été effectuée dans plusieurs études. La principale conclusion de ces études est la présence d'une hétérogénéité métabolique au niveau des cellules actives et inactives et au niveau de la taille des cellules, i.e. différents états métaboliques sont retrouvés en même temps dans une communauté bactérienne (Bernard *et al.* 2001; Bernard *et al.* 2000; Bernard *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002).

6. Problématique

En caractérisant le bactérioplancton selon son état métabolique et sa composition phylogénétique, on peut entrevoir que celui-ci a peut-être une différence entre les cellules qui est non négligeable. En effet, plusieurs études démontrent la présence d'une hétérogénéité au niveau des états métaboliques sans toutefois caractériser le lien entre les fractions hétérogènes. Pour la première partie de l'étude, le triage cellulaire sera caractérisé afin d'obtenir des fractions bactériennes, selon un état métabolique spécifique, le plus pur possible. Ensuite, la deuxième partie consiste à démontrer qu'il y aurait une différence de composition bactérienne entre les fractions (HNA vs LNA vs live vs dead) et entre les fractions triées et la communauté de bactéries aquatiques venant de différents milieux d'eau douce. Les états métaboliques ici étudiés sont les HNA, LNA et les cellules dont les membranes sont intactes (vivantes) et les cellules dont la membrane est endommagée (mortes). La principale question à l'étude est de montrer qu'à l'aide du triage cellulaire et de la biologie moléculaire il y a une différence au niveau de la composition entre la communauté totale de bactéries et les fractions triées selon leurs états métaboliques ce qui apportera une caractérisation nouvelle de la dynamique des communautés bactériennes ce qui pourrait nous aider à comprendre comment les bactéries réagiraient à des changements environnementaux.

CHAPITRE 1: CARACTÉRISATION ET EFFICACITÉ DU TRIAGE CELLULAIRE

RÉSUMÉ

Les bactéries ont un rôle important dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique parce que ce sont les joueurs clés de la boucle microbienne et du cycle du carbone. Les bactéries possèdent différentes capacités métaboliques et différentes activités dans l'environnement. En fait, dans une communauté bactérienne, ce ne sont pas toutes les bactéries qui sont actives également et il y a une gamme continue d'activités des cellules mortes aux cellules hautement actives. Il est encore imprécis de dire que l'activité est distribuée de façon homogène à travers toutes les espèces. Pour caractériser la distribution de l'activité, une récente technique est utilisée, soit la cytométrie en flux associée au triage cellulaire. Cet outil étant peu caractérisé sera à l'étude. L'exploration de l'efficacité du triage cellulaire par commutation avec le FACSCalibur sera ici effectuée. Dans cette étude, nous avons utilisé les fluorochromes Syto 13 et Baclight sur différents échantillons (souches bactériennes et bactéries d'eau douce) pour les séparer physiquement. Nous avons obtenu un facteur d'enrichissement plus faible lorsque le mélange était similaire.

Mots-clés : triage cellulaire, état métabolique, bactéries

INTRODUCTION

Plusieurs questions restent encore sans réponse dans le domaine de l'écologie aquatique microbienne au sujet des états physiologiques présents et leur influence dans la communauté bactérienne, comme par exemple, laquelle des fractions, au moment de l'échantillonnage, contribue à la majeure partie de la production bactérienne ou quel est le lien entre l'activité individuelle des cellules et les caractéristiques morphologiques de celles-ci comme la taille (Servais *et al.* 1999; Servais *et al.* 2001). Il est donc important d'étudier la dynamique des communautés microbiennes en termes d'activité, de caractéristiques morphologiques et de

taxonomie pour mieux cibler ces questions (Bernard *et al.* 2000). Les réponses pourront, ensuite, être très utiles pour mieux estimer le nombre de cellules en croissance, le taux spécifique de croissance de chacune de ces cellules et pour déterminer les affiliations taxonomiques (Lebaron *et al.* 2001). C'est pourquoi des outils, comme la biologie moléculaire, la cytométrie en flux et l'hybridation in situ par fluorescence, ont été utilisés afin de mieux cibler ces questions fondamentales (Vives-Rego *et al.* 2000; Boström *et al.* 2004; Castle et Kirchman, 2004).

Principe de la cytométrie en flux

Depuis quelques années, de nouvelles approches ont été mises au point pour promouvoir le développement de l'écologie microbienne et pour ensuite comprendre le rôle écologique des bactéries (Bernard *et al.* 2000). Une de ces nouvelles méthodes est la cytométrie en flux, qui permet d'évaluer plusieurs variables comme l'abondance bactérienne, la distribution de la taille et les caractéristiques biochimiques et physiologiques de cellules individuelles (Fuchs *et al.* 2000; Vives-Rego *et al.* 2000). Le principe de la cytométrie est le suivant, ces variables sont analysées en quelques secondes pour des milliers de cellules colorées simultanément lorsque celles-ci passent dans un jet d'eau jusqu'à une fenêtre de mesure où des lasers frappent ces cellules. Ces cellules sont excitées et émettent une fluorescence qui est perçue par des détecteurs. Ces signaux détectés sont transformés en signaux électroniques et sont envoyés au logiciel de cytométrie. Comme par exemple, la taille est déterminée avec la diffusion de la lumière (figure 1.1) (Vives-Rego *et al.* 2000).

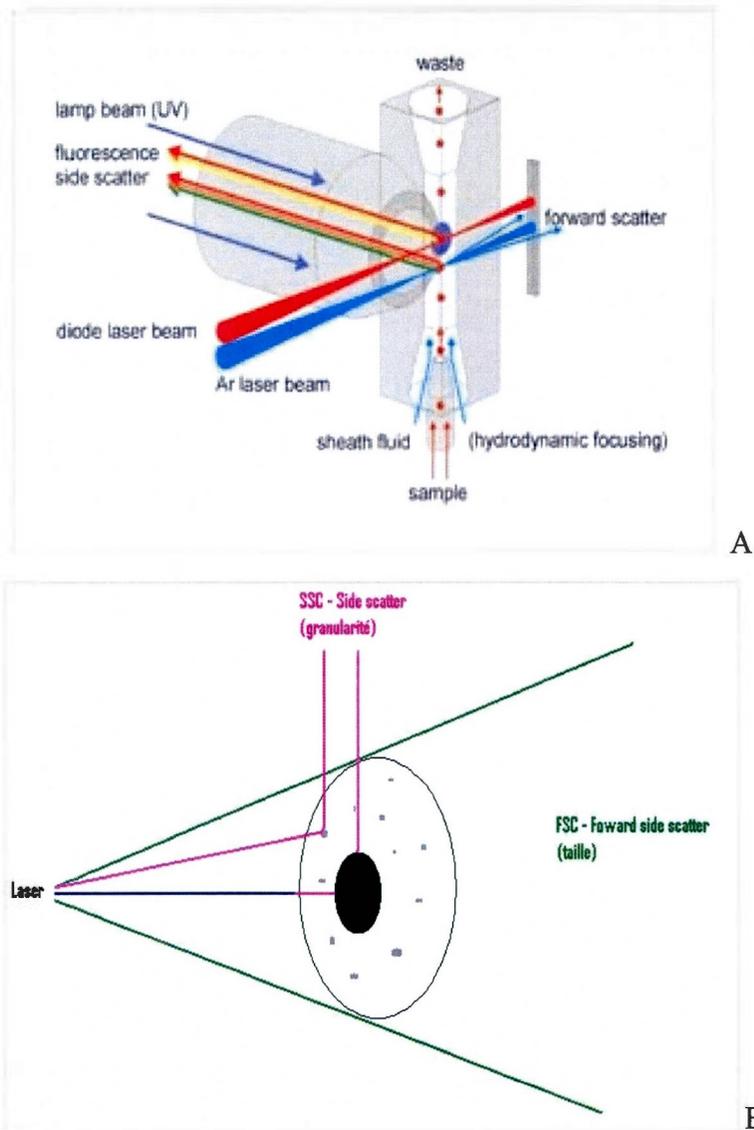


Fig. 1.1 A) Le fonctionnement du cytomètre en flux et B) La taille (FSC – forward side scatter) et la granularité (SSC – side scatter) déterminée par la cytométrie en flux

La cytométrie a trois qualités qui justifient son utilisation en écologie microbienne aquatique : la grande vitesse pour obtenir et analyser les données, la possibilité de triage cellulaire qui consiste à séparer physiquement une population préalablement définie et qui permet une analyse ultérieure soit physique, chimique, biologique et moléculaire et l'acquisition de données multiparamétriques (Wallner *et*

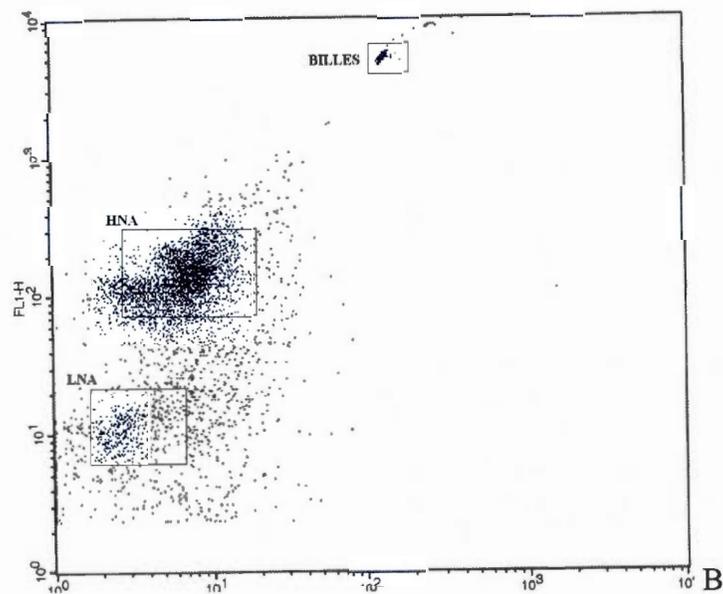
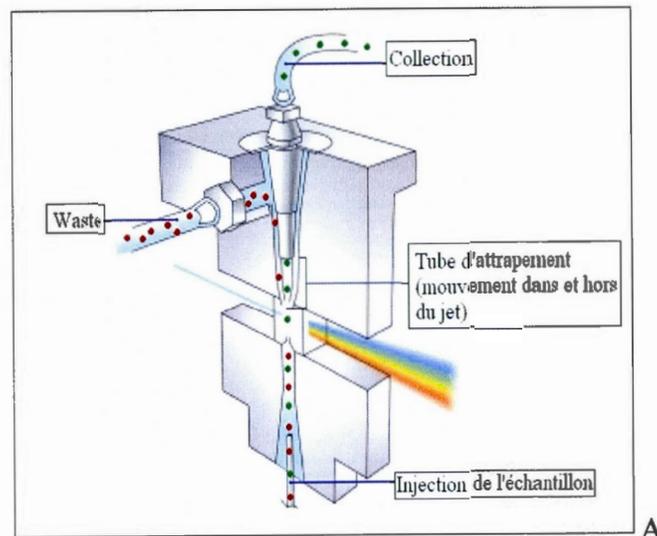
al. 1997; Vives-Rego *et al.* 2000). De plus, la cytométrie permet l'utilisation d'un échantillon vivant ou fixé au glutaraldéhyde, entre autre. Cela permet de garder les échantillons pendant plusieurs mois et la perméabilité des cellules augmente, donc le colorant est mieux absorbé. Il existe aussi quelques difficultés à tenir compte lors de l'utilisation du cytomètre et des fluorochromes nécessaires à l'observation des cellules : la petite taille des cellules, i.e. plus d'une cellule peuvent passer à la fois devant le laser, les colorant fluorescents et leurs interactions avec les bactéries, comme par exemple, les bactéries qui utilisent leur pompe pour expulser le colorant très rapidement, l'autofluorescence, l'attachement non-spécifique du colorant et l'inutilité des colorants démontrant la viabilité, les enzymes et le potentiel de la membrane lorsque les échantillons sont fixés (Vives-Rego *et al.* 2000).

Principe du triage cellulaire

Le cytométrie en flux, en plus d'analyser des échantillons selon plusieurs paramètres (fluorescence verte, rouge et orange et diffusion de la lumière), a la capacité de trier physiquement les cellules, i.e. les cellules cibles sont envoyées dans un compartiment et les cellules non cibles ne sont par gardées. Cependant, cet aspect a été peu utilisé en microbiologie aquatique (Servais *et al.* 1999). La séparation des fractions cellulaires est basée sur une sélection pré-définie des propriétés cellulaires, comme par exemple la fluorescence, qui peuvent être mesurées ou estimées par la cytométrie en flux à l'aide des cytogrammes où les bactéries apparaissent. Plusieurs traits peuvent être utilisés pour effectuer le triage cellulaire comme la diffusion de la lumière, les structures internes et l'intensité de la fluorescence des bactéries (Wallner *et al.* 1997).

Le triage est basé sur trois méthodes. La première méthode consiste à la destruction des cellules non cibles (« zapper »), la deuxième méthode est la déposition physique des cellules dans une goutte (« droplet sorter », triage par gouttes) et la troisième se base sur un changement mécanique des cellules contenues dans un flux liquide à l'aide d'un bras mécanique (« switch sorter », triage de

commutation, figure 1.2). Le triage par goutte est le plus commun et implique l'utilisation d'un flux vibrant à haute fréquence soit entre 30 et 50 kHz et contenant les cellules. Cette vibration permet la génération de gouttes uniformes dans un flux de liquide (Vives-Rego *et al.* 2000).



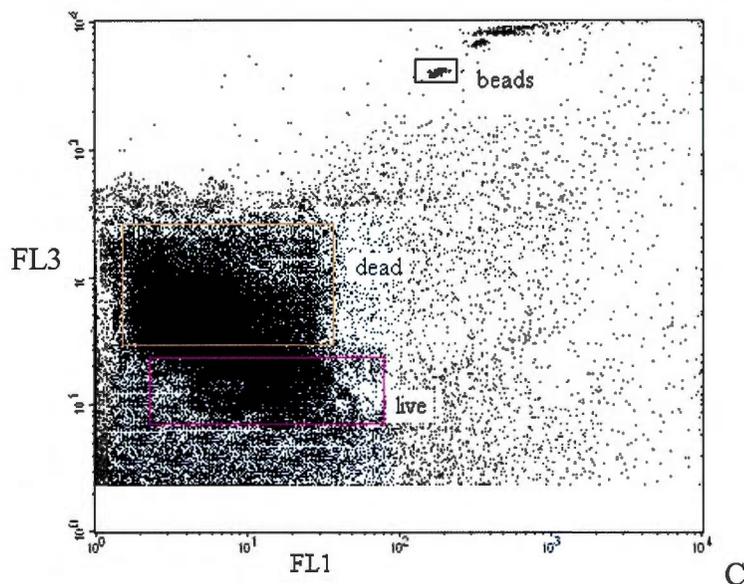


Fig. 1.2 Triage cellulaire par commutation (switch sorter) A) Le principe du triage cellulaire B) La séparation entre HNA et LNA C) La séparation entre cellules vivantes et endommagées

Le triage permet, entre autre, l'isolation de cellules selon leur état physiologique et ensuite l'identification des cellules via l'extraction de l'ADN, le PCR et la DGGE. Le triage est donc utile pour étudier différents états métaboliques dans un échantillon naturel. Cependant, le triage a une limitation pour les systèmes aquatiques naturels, car un échantillon peut contenir une grande variété de cellules, donc il peut être difficile de cibler un groupe de cellules assez semblables. Aussi, le bruit de fond due à la diffusion de la lumière, le bruit électronique de l'appareil et la réflexion supplémentaire sur la surface du jet d'eau lors de la génération de la goutte rendent le triage cellulaire et l'atteinte d'une fraction triée avec un maximum de pureté plus difficiles (Wallner *et al.* 1997). De plus, il existe un problème potentiel au niveau de la contamination. En effet, le triage est effectué dans des compartiments ouverts ce qui laisse place à des contaminants environnementaux. Un contrôle stérile au niveau du liquide de dilution et des compartiments ouverts est donc nécessaire (Vives-Rego *et al.* 2000). Une sélection attentive du mode de triage (tableau 1.1) est

aussi importante car selon le mode choisi, la pureté ou la récupération du triage peuvent changer.

Tableau 1.1 Comparaison entre les trois modes de triage cellulaire

Mode	Pureté	Récupération
Single-cell	Maximum	Minimum
Exclusion	Intermédiaire	Intermédiaire
Recovery	Minimum	Maximum

Comparaisons entre cytomètres pour des comptages totaux

Plusieurs types de cytomètres, de paramètres et de colorants sont utilisés pour le comptage de l'abondance bactérienne. Dans les études publiées, deux instruments sont généralement utilisés pour le comptage bactérien soit le FacsCalibur et le Coulter Epics ELITE. Les principaux paramètres regardés sont la fluorescence verte et la diffusion de lumière à 90° en utilisant les colorants Syto 13, SYBR I et SYBR II qui colorent les acides nucléiques (del Giorgio *et al.* 1996 ; Servais *et al.* 1999 ; Bernard *et al.* 2000 ; Bernard *et al.* 2000 ; Lebaron *et al.* 2001 ; Resina-Pelfort *et al.* 2001 ; Servais *et al.* 2001 ; Lebaron *et al.* 2002).

Comparaisons entre les triages cellulaires

Lors du triage cellulaire, plusieurs appareils et paramètres sont utilisés. Quatre principaux instruments sont privilégiés, soient le FacsCalibur, le FacsStar, le FacsVantage et le Coulter Epics Elite. Le FacsCalibur est le seul instrument qui effectue un triage en commutation, les trois autres instruments font le triage par gouttes. Les colorants, les paramètres, le nombre de cellules triées et la vitesse de passage peuvent varier selon les études effectuées. De plus, le principal mode utilisé lors d'études en écologie aquatique est le mode « single-cell » ou « normal R ». Ce mode est justifié par une pureté élevée (une seule cible identifiée) et une récupération

minimale de cellules tout en ayant un compte précis de ces cellules (Wallner *et al.* 1997; Lebaron *et al.* 2001; Servais *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002). Un autre point pris en considération lors de ces études est l'ajustement de la salinité du liquide de dilution. La salinité est ajustée à celle de l'échantillon, lorsqu'il s'agit d'un échantillon marin, car la lyse cellulaire ou le relâchement des protéines dû au choc osmotique est ainsi évité (Lebaron *et al.* 2001; Servais *et al.* 2001). De plus, le liquide de dilution doit être contrôlé, i.e être le plus stérile possible, tout comme le cytomètre, pour éviter la contamination microbienne (Fuchs *et al.* 2000; Resina-Pelfort *et al.* 2001). Finalement, selon les études et les questions posées, la sélection des cellules cibles, faite à l'aide du cytogramme, est déterminée arbitrairement par l'utilisateur du cytomètre (Bernard *et al.* 2000). Aussi, la récupération des cellules peut être facilitée à l'aide d'un concentrateur ce qui est laissé à la guise de l'utilisateur et au type d'études effectuées (Bernard *et al.* 2000).

Études précédemment effectuées utilisant la cytométrie en flux et le triage cellulaire

Quelques études ont utilisé le triage pour comprendre les processus à l'intérieur d'une communauté microbienne aquatique (Bernard *et al.* 2000; Bernard *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002). Mais avant de répondre à ces questions, il est intéressant de savoir si le triage cellulaire est vraiment efficace. Tout d'abord, la définition de certains termes s'imposent. La récupération est définie comme étant le pourcentage des cellules récupérées (cibles et non cibles) dans le poste de collecte par rapport au nombre total de cellules passées devant le laser. La pureté de l'échantillon est définie comme le pourcentage des cellules cibles sur le nombre total de cellules triées (non cibles et cibles) et l'efficacité comme étant le ratio entre le rapport des cellules cibles versus les cellules non cibles du poste de collecte et le rapport entre les cellules cibles sur les cellules non cibles du départ. Le facteur d'enrichissement est quant à lui défini par le ratio entre les cellules cibles et non cibles du poste de collecte et entre les cellules cibles et non cibles de l'échantillon de départ. Pour les souches bactériennes, l'efficacité du triage est en moyenne de 33%, la récupération varie entre

98 et 100%, la pureté est, en moyenne, de 95% et le facteur d'enrichissement est d'environ 5, i.e. le ratio des cellules cibles versus les cellules non cibles est cinq fois plus élevé dans le poste de collecte que dans l'échantillon de départ (Wallner *et al.* 1997; Nebe-von Caron *et al.* 1998; Resina-Pelfort *et al.* 2001). Pour les échantillons marins, l'efficacité est en moyenne de 99% (Resina-Pelfort *et al.* 2001) et pour les échantillons d'eau douce, la pureté obtenue est près de 100% (Wallner *et al.* 1997). Pour des échantillons de boue, l'échantillon est enrichi en moyenne entre 5 et 280 fois et la pureté pour trois triages différents est de 76, 54 et 66% respectivement, mais cette pureté augmente à 91, 76 et 88%, lorsqu'un deuxième triage est effectué sur ces mêmes échantillons (Wallner *et al.* 1997). L'efficacité du triage, la pureté des échantillons triés et le facteur d'enrichissement varient beaucoup et tout cela dépend des échantillons et de l'instrument utilisé (triage par goutte).

Problématique

Malgré tous ces avantages et ces inconvénients, le triage cellulaire reste une méthode exploitée, mais peu définie quant à ces caractéristiques de rendement. Selon les études précédentes, le triage cellulaire semble avoir une bonne récupération des cellules tout en augmentant la pureté (un maximum de cellules cibles) et l'enrichissement de cellules (rapport des cellules cibles sur les cellules non cibles de la fraction triée par rapport à l'échantillon de départ). Mais ces résultats ne sont valables que pour le triage par goutte. À ma connaissance, aucun article scientifique n'existe jusqu'à présent dans la littérature en ce qui concerne les capacités du triage cellulaire par commutation ou pour le type « zapper ». Même si des études ont été publiées (Fuchs *et al.* 2000; Bernard *et al.* 2001) en utilisant ces deux derniers appareils, la récupération, l'enrichissement et la pureté ne sont pas exprimés ou s'ils le sont, il n'y a aucune expérience qui démontre le chemin parcouru pour y arriver et pour justifier l'utilisation de cet appareil. De plus, plusieurs modes sont disponibles dont le mode « single cell » qui permet d'avoir une pureté maximale et une récupération minimale, mais l'utilisation de ce mode n'est jamais justifié (Lebaron *et*

al. 2002). La seule justification mentionnée est celle donnée par le manuel d'instruction, mais aucun test n'est mentionné pour comparer la réelle différence entre les différents modes possibles lors du triage cellulaire. C'est pourquoi la première partie de ma maîtrise est consacrée à la caractérisation du triage cellulaire. La caractérisation sera faite pour l'appareil FacsCalibur de Becton Dickinson (triage par commutation) en tenant compte du facteur d'enrichissement de la population. De plus, les trois modes disponibles pour trier ont été testés soient « single cell » (maximum de pureté, minimum de rendement), « recovery » (minimum de pureté, maximum de rendement) et « exclusion » (le mode intermédiaire). Aussi, différents mélanges de différentes complexités ont été testés pour évaluer la fenêtre de jeu de l'appareil. Toute cette expérimentation a permis de mieux définir l'appareil et les fonctions utilisées et de justifier son utilisation pour étudier la question principale de cette thèse lors du deuxième chapitre.

MÉTHODOLOGIE

Préparation d'eau pour le cytomètre en flux

De l'eau nanopure a été filtrée deux fois de suite à l'aide d'une cartouche Millipore 300K et emmagasinée dans des erlenmeyers préalablement lavés à l'acide chlorhydrique et stérilisés. Cette eau a été ensuite stérilisée pendant 30 minutes à 121°C et entreposée à la température de la pièce. De plus, un échantillon de cette eau filtrée est compté au microscope à épifluorescence pour s'assurer que l'eau ne contienne qu'un minimum de bactéries. L'eau a été utilisée à l'intérieur du cytomètre comme liquide de dilution pour l'échantillon principal.

Cytométrie en flux

Des échantillons provenant de lacs de 0,5ml préalablement colorés avec 1.5µl de LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes) et incubés pendant 10 minutes à la noirceur, ont été passés au FACSCalibur (Becton Dickinson), cytomètre en flux. Ce

produit composé de Syto 9 et d'iodide de propidium permet de différencier les cellules avec une membrane intacte (cellules vertes) de celles avec une membrane endommagée (cellules rouges). Des billes (Molecular Probes) de $1\mu\text{m}$ de fluorescence verte et de concentration initiale de 1277 billes/ μl ont été ajoutées au mélange pour servir de mesure de référence. Chaque échantillon a été analysé selon la fluorescence rouge (en y) et la fluorescence orange (en x).

Triage cellulaire

Le triage cellulaire a été effectué de façon mécanique avec le FACSCalibur (Becton Dickinson) selon un des trois modes disponibles. Les trois modes utilisés ont été « single-cell », « recovery » et « exclusion ». De plus, l'eau filtrée a été utilisée comme l'eau du réservoir dans lequel l'échantillon sera dilué pour garder le taux de contamination le plus bas possible. Une partie de l'échantillon de 0.5 ml coloré avec le LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes) a été ciblée avec une fenêtre de sélection, ce qui permettra de différencier entre les cellules vertes et rouges (fluorescence rouge et fluorescence orange). Cette fraction a été envoyée à un poste de collecte où l'on collecte entre 400 et 1000 ml d'échantillon trié en moyenne après une récupération minimale de $2 \cdot 10^6$ cellules cibles et non cibles. Le reste de l'échantillon dilué a été envoyé au réservoir des déchets du cytomètre, où entre 1000-2000 ml seront récupérés pour des analyses futures.

Plusieurs types de mélange ont été analysés afin de déterminer le facteur d'enrichissement sur différent types de mélanges (2 réplicats pour chaque mélange): billes de différentes tailles ($0,5\mu\text{m}$, $1\mu\text{m}$ et $0,2\mu\text{m}$), billes ($1\mu\text{m}$) et *Escherichia coli*, *Escherichia coli* dont une partie a été tuée par un traitement à la chaleur (100°C pendant 5 minutes), un échantillon du lac Bowker et *Escherichia coli* et un mélange de *Staphylococcus epidermis* et *Escherichia coli* (échantillon bactérien donné par le laboratoire d'enseignement de microbiologie de l'UQAM). Dans les mélanges contenant les billes, ce sont les billes de $0,2\mu\text{m}$ qui se rapprochent de la taille des

bactéries que l'on retrouve dans les milieux aquatiques. De plus, des échantillons (un réplicat) des lacs Fraser, Des Monts, Brome, Simoneau, Stukely, Bran-de-Scie, Bowker et les entrées des lacs Fraser et Bran-de-Scie ont été aussi triés pour comparer l'efficacité des comptes du cytomètre et de la microscopie à épifluorescence afin de voir la précision des comptes donnés par le cytomètre. Chaque échantillon provenant de l'eau des lacs ou des entrées a été récolté au niveau de l'épilimnion à l'aide d'une bouteille de plastique. Le nombre de cellules récoltées dans chaque fraction (500 ml pour le poste de collecte et 1L pour le réservoir des déchets) a été ensuite analysé par microscopie d'épifluorescence pour en déterminer le facteur d'enrichissement. La microscopie est utilisée car les bactéries, une fois triées, n'apparaissent pas au même emplacement sur le cytogramme, car celles-ci ont subi un choc dû au laser et à la pression à l'intérieur de l'appareil, ce qui rend le facteur d'enrichissement difficile à évaluer.

Microscopie d'épifluorescence

La microscopie d'épifluorescence est utilisée pour compter les bactéries et comparer les comptes microscopiques avec les comptes cytométriques pour en déterminer le facteur d'enrichissement. Chaque échantillon dilué provenant du triage a été filtré sur un filtre de 0.2 μ m (Whatman). Pour l'échantillon original (avant triage), deux millilitres ont été filtrés et pour les échantillons triés, quarante millilitres ont été filtrés. Chaque échantillon (2 réplicats pour les mélanges et 1 réplicat pour le triage des lacs ou des entrées) a été compté à l'aide du microscope d'épifluorescence (Olympus BX51). Le fluorochrome Syto 13 est excité à 488nm et sa fluorescence est émise à 509 nm (Anonyme, 2003); fluorochrome Baclight, est excité à 480nm et la fluorescence émise est à 500 nm et pour le Syto 9 et pour le propidium iodine, il est excité à 490nm et la fluorescence est émise à 635nm (Anonyme, 2004). Pour l'échantillon brut, cinq grilles de microscopes ont été dénombrées et quarante grilles ont été comptées pour les échantillons triés.

Analyses statistiques

Pour chaque analyse et comparaison, des ANOVAS ont été faites pour comparer s'il y avait ou non une différence significative entre les échantillons répliqués à l'aide du logiciel JMP version 5.0.

RÉSULTATS

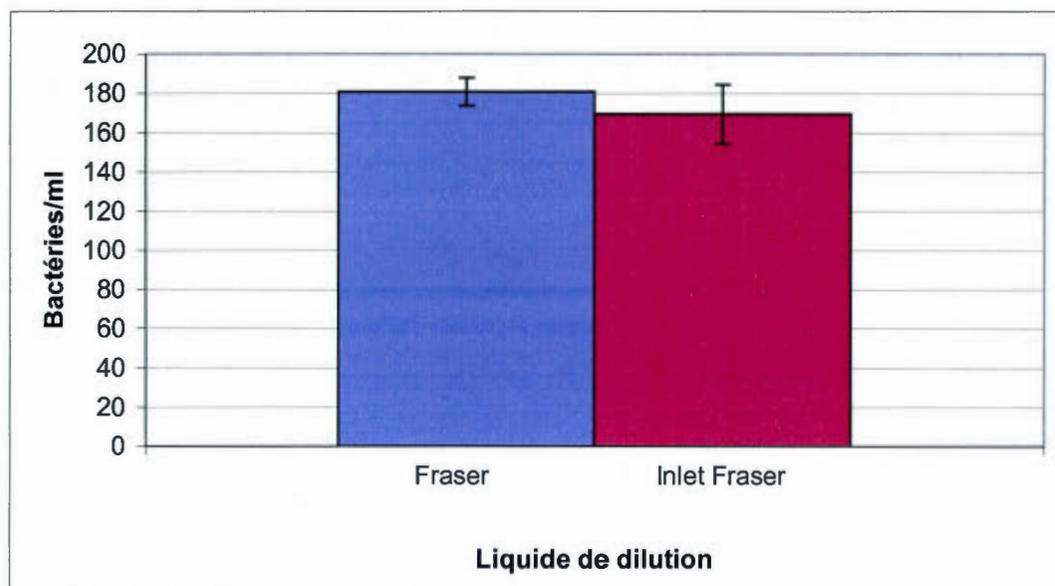


Fig. 1.3 Réplication des comptages bactériens fait par la microscopie d'épifluorescence sur le liquide de dilution utilisé lors du triage d'un lac (Fraser) et son entrée (Inlet Fraser)

Des comptages bactériens ont été effectués pour le liquide de dilution avec lequel un triage cellulaire a été effectué. Ce liquide de dilution a été utilisé pour le triage du lac (Fraser) et un autre pour le triage d'une rivière se jetant dans Fraser. La figure 1.3 montre que la moyenne des comptes (deux pour chacun) pour Fraser et son entrée est très bonne car, selon l'ANOVA, il n'y avait aucune différence significative ($P > 0.2590$) entre les comptes. L'abondance bactérienne du liquide de dilution varie entre $1,81 \cdot 10^2 \pm 7$ et $1,70 \cdot 10^2 \pm 15$ bactéries/ml pour le triage du lac et de la rivière respectivement. Cela signifie que le liquide de dilution aura peu d'influence au

niveau de l'ajout de bactéries lors du triage des échantillons des lacs, comme par exemple pour le lac Fraser, si on recueille 400 ml d'eau (liquide de dilution et échantillon) dans le poste de collecte, $7,2 \cdot 10^4$ cellules venant du liquide de dilution seront ajoutées sur un total de $2 \cdot 10^6$ bactéries présentes dans l'eau de Fraser ce qui représente 3,6% de l'échantillon trié et de plus les comptes microscopiques ne varient pas grandement entre eux.

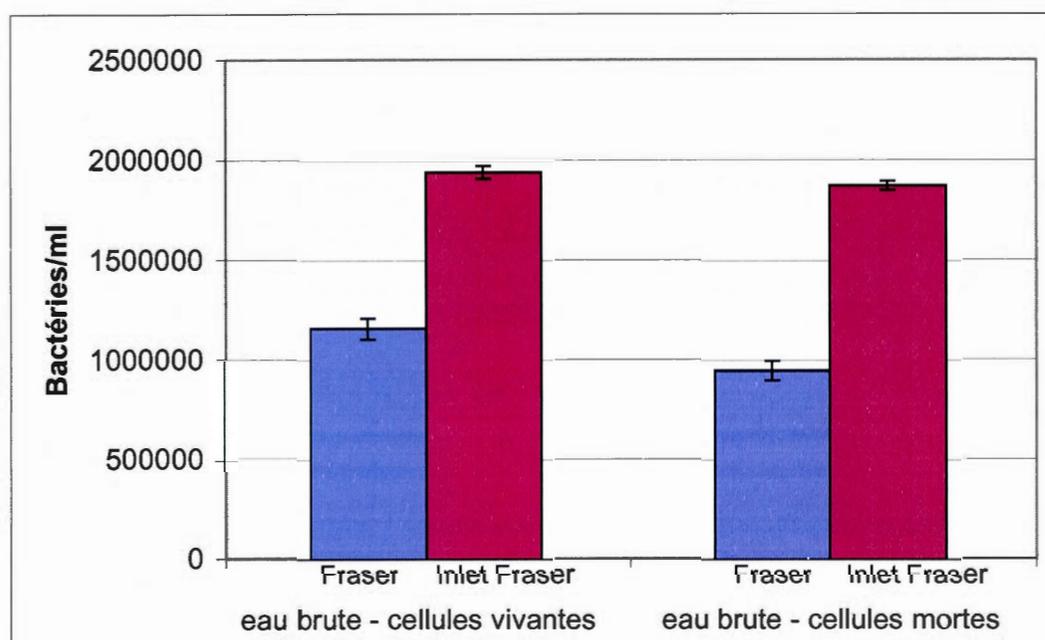


Figure 1.4 Réplication des comptages à la microscopie à épifluorescence de deux échantillons d'eau brute, soit d'un lac (Fraser) et de son entrée (Inlet Fraser) colorés au Baclight

Les comptages, montrés à la figure 1.4, ont été faits sur les échantillons bruts du lac Fraser et de la rivière se jetant dans le lac Fraser et colorés avec le Baclight. La vérification des comptages effectués à la microscopie à épifluorescence était bonne car il n'y avait aucune différence significative ($P > 0.3978$) entre ceux-ci selon l'ANOVA.

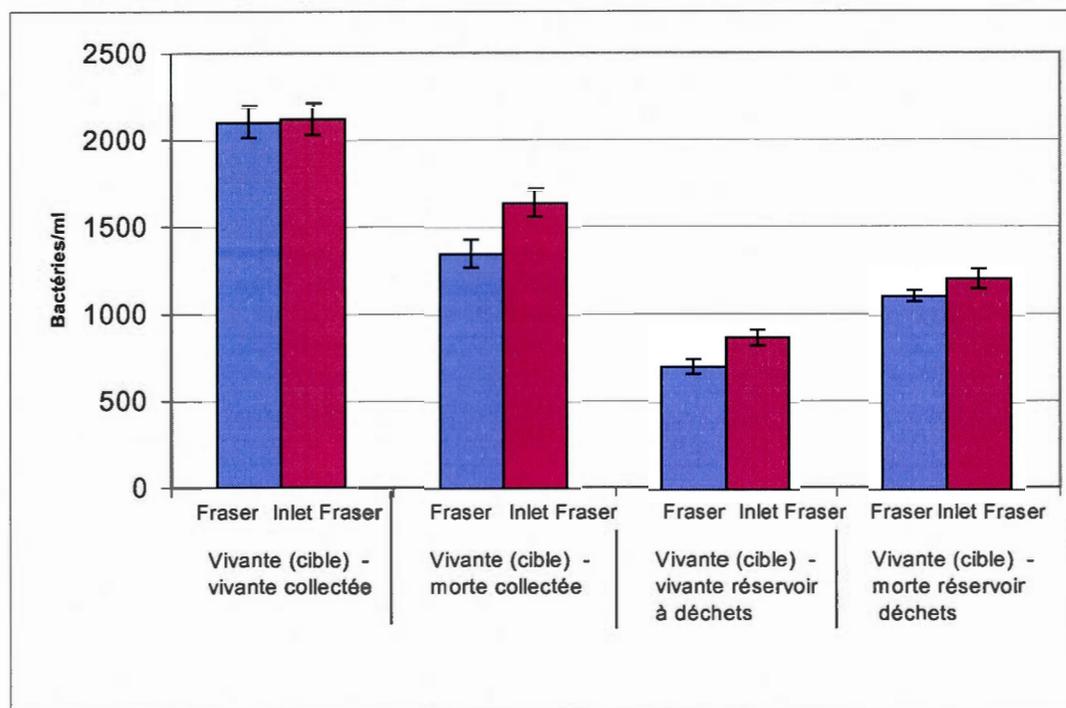


Figure 1.5 Comparaison des réplifications des comptages bactériens à la microscopie à épifluorescence pour des échantillons triés et colorés au BacLight d'un lac (Fraser) et de son entrée (Inlet Fraser)

La figure 1.5 montre l'écart minime qu'il y a entre les réplifications pour les différents comptages au BacLight faits avec la microscopie d'épifluorescence pour le lac Fraser et la rivière se jetant dans le lac Fraser. Pour le lac Fraser, dans la fraction collectée, on a observé $2.11 \cdot 10^3 \pm 88$ et $1.35 \cdot 10^3 \pm 77$ bactéries/ml pour les cellules vivantes et mortes respectivement. Pour ce même lac, mais pour la fraction qui se retrouve dans le réservoir des déchets, on a trouvé pour les cellules vivantes $7.02 \cdot 10^2 \pm 41$ bactéries/ml et $1.11 \cdot 10^3 \pm 32$ bactéries/ml pour les cellules mortes. Pour la rivière se jetant dans le lac Fraser, les cellules vivantes et mortes représentent $2.12 \cdot 10^3 \pm 89$, $1.64 \cdot 10^3 \pm 77$ bactéries/ml pour la fraction collectée et $8.68 \cdot 10^2 \pm 46$ et $1.21 \cdot 10^3 \pm 56$ bactéries/ml pour l'autre fraction. Ceci démontre que les comptages au microscope sont fiables et reproductibles car il n'y avait aucune différence significative ($P > 0.4528$) entre les réplifications.

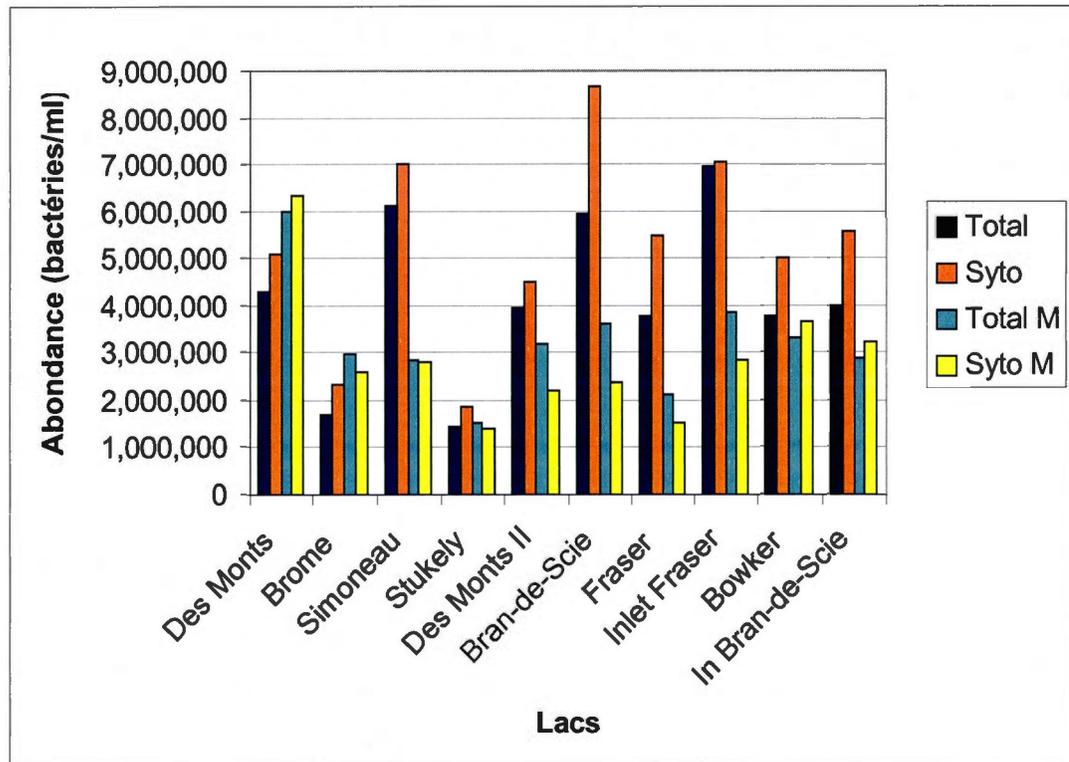


Fig.1.6 Comparaison entre les comptages bactériens du cytomètre en flux et de la microscopie à épifluorescence (Total (BacLight) et Syto pour cytomètre en flux et total M (BacLight) et Syto M pour comptes au microscope à épifluorescence)

La comparaison des comptes au cytomètre et à la microscopie à épifluorescence est démontrée à la figure 1.6 afin d'établir si une différence existe entre les deux méthodes de comptage. Pour chacun de ces comptes, seulement un réplicat a été fait. Pour le colorant Syto 13, et après une ANOVA il y a une différence significative ($P > 0.0246$) entre les comptages au cytomètre en flux et les comptages avec le microscope d'épifluorescence. Suite à une ANOVA, il n'y avait aucune différence significative ($P > 0.7878$) entre les comptages au BacLight au cytomètre et à la microscopie. Aussi, il n'y a aucune différence significative (ANOVA) entre l'utilisation des produits Syto 13 et BacLight ($P > 0.5399$) au niveau du compte total des bactéries pour chaque lac. Le nombre total de bactéries variait

entre $1,4 \cdot 10^6$ bactéries/ml et $8,6 \cdot 10^6$ bactéries/ml pour les comptes faits au cytomètre et variait entre $1,4 \cdot 10^6$ et $6,4 \cdot 10^6$ bactéries/ml pour les comptes faits avec le microscope à épifluorescence. Cela démontre que les deux produits utilisés ciblent la totalité des bactéries présentes dans l'échantillon et que pour le Baclight, les deux méthodes sont valables pour dénombrer les bactéries. Tandis qu'avec le fluorochrome Syto 13, une attention doit être portée à la méthode utilisée car une différence entre les comptes de cytométrie et du microscope est présente.

Tableau 1.2 Moyenne de la pureté et de la récupération dans les triages de billes de $0,5\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$ et $0,2\mu\text{m}$, $0,5\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$.

Triage	Mode	Récupération (%)	Pureté (%)
0.5 μm et 1 μm (mélange de départ ratio 0.9863)	Single-cell	29.4	79.6
	Exclusion	32.4	89.6
	Recovery	35.5	90.1
0.2 μm , 0.5 μm et 1 μm (mélange de départ ratio 0,5068)	Single-cell	21.9	77.3
	Exclusion	23.6	77.1
	Recovery	29.7	87.2

Le tableau 1.2. montre les différents taux de récupération et de pureté obtenus lors des divers triages de billes fluorescentes, soit un triage entre les billes $0,5\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$ et soit un triage entre les billes de $0,2\mu\text{m}$, $0,5\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$. Dans les deux cas, la récupération et la pureté étaient maximales pour le mode « recovery ».

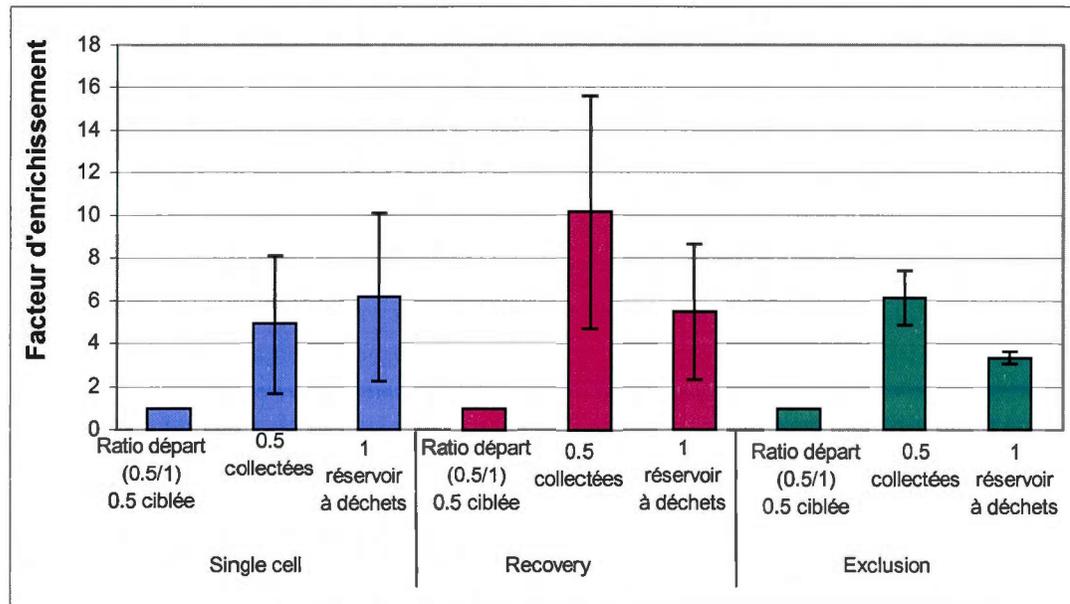


Fig. 1.7 Différents facteurs d'enrichissement obtenus lors d'un triage d'un mélange de billes fluorescentes de 0.5 et 1 μm avec les trois modes de triage disponibles

Les facteurs d'enrichissement, i.e. pour le poste de collecte, le ratio entre le ratio du poste de collecte (cellules cibles sur les cellules non cibles) sur le ratio de l'échantillon départ (cellules cibles sur cellules non cibles) et pour le réservoir des déchets, le ratio de l'échantillon de départ sur le ratio des cellules non retenues par le cytomètre, obtenus lors de triage cellulaire (figure 1.7) illustrent que la première colonne de chaque mode correspond au ratio initial entre les billes fluorescentes de 0.5 et 1 μm avant le triage cellulaire qui était de 0.99. La deuxième colonne de chaque mode représente le facteur d'enrichissement pour les billes de 0.5 μm collectées qui étaient les billes cibles du mélange. Finalement, la troisième colonne représente le facteur d'enrichissement pour les billes de 1 μm récupérées dans le réservoir des déchets à la fin du triage. Chaque mode a été testé trois fois. Pour le mode « single cell », le facteur d'enrichissement pour le poste de collecte était de 4.88 ± 3.22 et pour le réservoir des déchets (contenant toutes les cellules non triées) de 6.15 ± 3.93 . Pour le mode « recovery », le facteur d'enrichissement était de 10.14

± 5.45 et de $5,49 \pm 3,18$ pour le poste de collecte et le réservoir des déchets respectivement. Enfin, pour le mode « exclusion », le facteur était de 6.12 ± 1.30 pour les billes récupérées dans le poste de collecte et de 3.33 ± 0.28 pour le réservoir des déchets. Pour la fraction collectée, il n'y avait aucune différence significative ($P > 0.3380$) entre les divers facteurs d'enrichissement et pour la fraction réservoir à déchets, il n'y avait pas de différence significative ($P > 0.6419$) pour les facteurs d'enrichissement. Donc, pour le triage entre billes de $0.5\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$ il n'y a aucune différence entre les modes de triage.

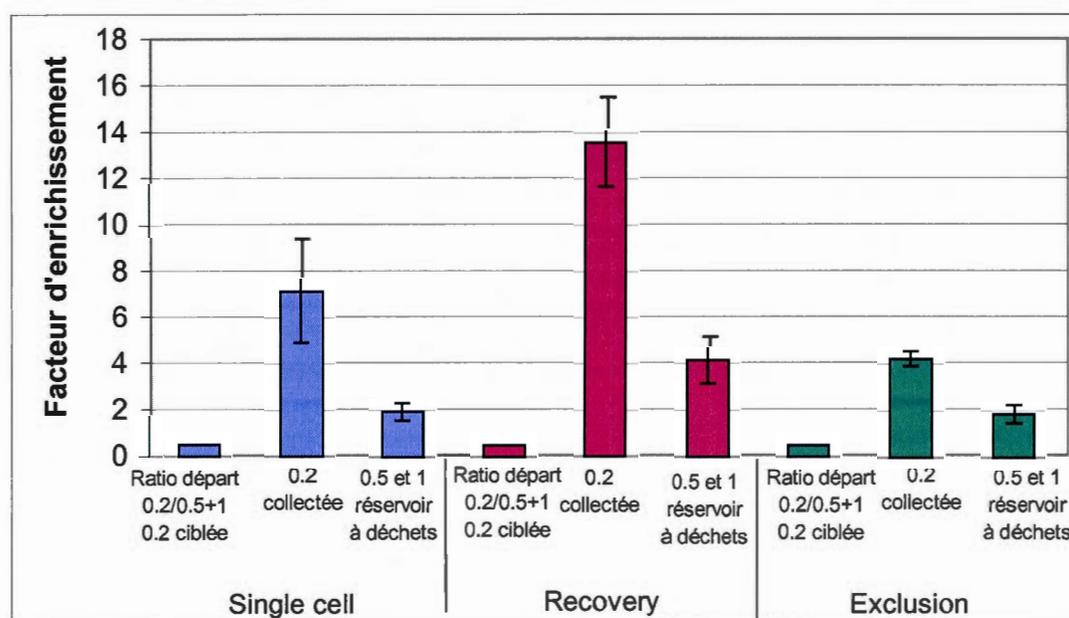


Fig. 1.8 Différents facteurs d'enrichissement obtenus lors de triage d'un mélange de billes fluorescentes de 0.2, 0.5 et $1\mu\text{m}$ avec les trois modes de triage disponibles

La figure 1.8 démontre les facteurs d'enrichissement obtenus après des triages cellulaires sur des mélanges contenant trois tailles de billes. Un différent mélange de billes (0.2, 0.5 et $1\mu\text{m}$) a été trié et dont les cibles étaient les billes de $0.2\mu\text{m}$. La première colonne de chaque mode correspond au ratio initial entre les billes fluorescentes de $0.2\mu\text{m}$ sur 0.5 et $1\mu\text{m}$ avant le triage cellulaire qui était de 0.51. La deuxième colonne de chaque mode représente le facteur d'enrichissement pour les

billes de 0.2µm collectées qui étaient les billes cibles du mélange. Finalement, la troisième colonne représente le facteur d'enrichissement pour les billes de 0.5 et 1µm récupérées dans le réservoir des déchets à la fin du triage. Chaque mode a été testé trois fois. Pour le mode « single cell », le facteur d'enrichissement pour le poste de collecte était de 7.14 ± 2.21 et pour le réservoir des déchets de 1.93 ± 0.38 . Pour le mode « recovery », le facteur d'enrichissement était de 13.58 ± 1.92 et de 4.13 ± 0.98 pour le poste de collecte et le réservoir des déchets. Enfin, pour le mode « exclusion », le facteur était de $4.24 \pm 0,1$ pour les billes récupérées dans le poste de collecte et de 1.85 ± 0.39 pour la poubelle. Pour les deux fractions (collectées et « waste »), il y avait une différence significative ($P > 0.0058$ et $P > 0.0181$) entre les divers facteurs d'enrichissement. Alors le mode sélectionné est le mode « recovery » car il donne un meilleur facteur d'enrichissement tant pour le poste de collecte que le réservoir des déchets.

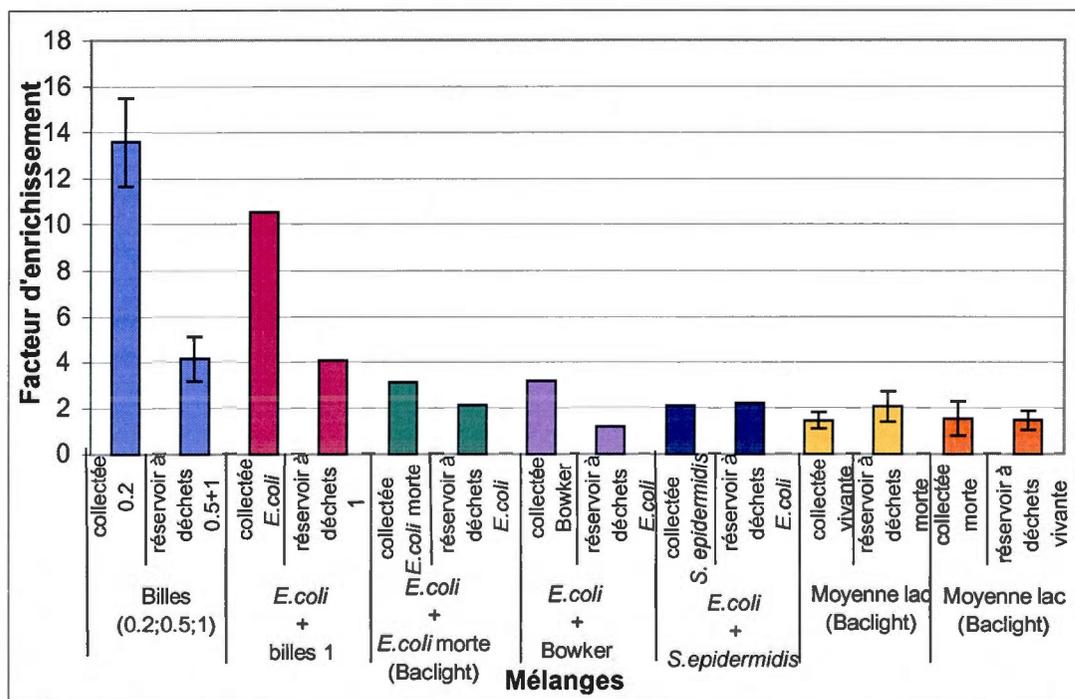


Figure 1.9 Comparaison entre les différents facteurs d'enrichissement de la partie collectée et la partie se retrouvant dans le réservoir des déchets de divers mélanges à des complexités différentes

La comparaison entre divers mélanges complexes au niveau de leur facteur d'enrichissement est montrée par la figure 1.9. Le facteur d'enrichissement diminue plus la complexité (homogénéité) du mélange augmente, i.e. les cellules sont plus petites, plus semblables et plus hétérogènes au niveau métabolique et de plus elles apparaissent environ au même niveau sur un cytogramme, d'où la difficulté de les séparer entre elles (un échantillon de bactéries présentes dans un lac (complexité plus élevée) comparé au mélange entre les bactéries d'un lac et *Escherichia coli* (complexité plus faible)). Le facteur d'enrichissement est passé de 13.58 ± 1.92 pour le poste de collecte et de 4.13 ± 0.98 pour le réservoir des déchets à 1.42 ± 0.34 et 2.06 ± 0.66 pour le poste de collecte (cellules vivantes et mortes) et de 1.53 ± 0.73 et 1.44 ± 0.40 pour le réservoir des déchets (cellules mortes et vivantes). De plus, tous ces triages ont été faits avec le mode «recovery» et le colorant baclight. La différence entre les facteurs d'enrichissement du poste de collecte et du réservoir des déchets est due au fait, que l'échantillon est beaucoup plus dilué que l'échantillon contenu dans le récipient qui collecte toutes les cellules non cibles. Aussi, cette fraction contient toutes les bactéries non cibles, mais aussi les bactéries cibles qui n'ont pas été envoyées dans le poste de collecte car elles étaient attachées à des cellules non cibles.

DISCUSSION

Réplifications des comptages

Une vérification pour les répliquats des comptages microscopiques est nécessaire pour s'assurer qu'il n'y ait pas de grandes variations entre les comptes pour un même échantillon et entre les échantillons. Une réplification a été faite sur l'eau qui sert de liquide de dilution dans le cytomètre, sur deux échantillons originaux faits avec le BacLight, et sur le triage de deux échantillons faits aussi avec le Baclight. Une comparaison (ANOVA) entre les différentes réplifications pour chaque groupe d'échantillon a été faite et n'ayant aucune différence significative entre les

différents comptages, la comparaison entre les comptes pour les différents lacs et rivières peut donc être effectuée sans avoir d'impact majeur sur les résultats finaux.

Cytométrie en flux versus microscopie à épifluorescence

Il n'y avait aucune différence significative entre les comptages au cytomètre en flux et les comptages à la microscopie à épifluorescence, sauf en utilisant le Syto 13. Cette différence n'a pas été observée avec le Baclight parce que l'incubation avec ce fluorochrome est d'une heure au lieu de cinq minutes pour le Syto 13 et donc, l'autofluorescence et la présence des cristaux de colorants ont pu diminuer avec le temps ce qui enlève le compte de faux événements avec le cytomètre. Les comptes au Syto 13 à la cytométrie en flux étaient plus élevés pour plusieurs raisons. Premièrement, tous les événements que le cytomètre voit ne sont pas nécessairement des bactéries préalablement colorées. D'autres particules ou organismes peuvent être fluorescents sans toutefois être des bactéries, comme des cristaux de colorant (Noble et Furhman, 1998; Peduzzi et Schiemer, 2004). Deuxièmement, il y a toujours un bruit de fond minimal qui existe, même si le cytomètre est propre. Ce bruit de fond est qualifié de bruit électronique provenant du cytomètre lui-même et provoqué par les lasers ou des particules entrant en contact avec ceux-ci. Ce bruit de fond ne peut être quantifié par un échantillon neutre. Cet ajout fait que les comptages au cytomètre peuvent être plus élevés que ceux du microscope à épifluorescence car ces différents types d'ajout ne sont pas comptés par la personne observant au microscope car il y a une différence de taille, de forme ou de fluorescence entre ces événements. Des comptes cytométriques statistiquement plus élevés que des comptes microscopiques ont été aussi observés par Chen et Li (2005) en utilisant les colorants acridine orange (acides nucléiques) et le propidium iodide (intégrité de la membrane) car des pertes cellulaires dues à la préparation des échantillons pour le microscope peuvent être encourues. Nos observations confirment donc, (pour certain cas ici le Syto 13), les résultats sur l'augmentation des comptes cytométriques par rapport aux comptes microscopiques.

Triage de billes de 0.5 et 1µm

Dans ce mélange de billes, ce sont les billes de 0.5µm qui étaient les cibles car elles se rapprochent de la taille des bactéries que l'on retrouve dans les milieux aquatiques. En effet, la taille des bactéries de milieux lacustres se situe entre 0.01 et 0.2 µm³ (Cole *et al.* 1993). Le facteur d'enrichissement a été déterminé par le ratio entre le ratio des billes de 0.5 et 1µm triées et le ratio de ces mêmes billes au départ. En plus de regarder le facteur d'enrichissement du poste de collecte, le facteur d'enrichissement du réservoir des déchets a été déterminé. En effet, dans ce réservoir des déchets, l'opposé du poste de collecte est retrouvé, soit les billes de 1µm. Donc un enrichissement de ces billes est observé. Entre ces trois modes, aucune différence statistique n'a été trouvée. Malgré tout, le mode « recovery » semble un peu plus efficace que les autres. Le mode « recovery » consiste à un mode de triage avec un maximum de pureté (une moyenne de 90%), contrairement à la théorie qui indique un minimum de pureté (ce qui peut être dû à un manque d'ajustement du trieur), et un maximum de rendement (une moyenne de 36%), i.e. lorsqu'une cellule cible apparaît dans la fenêtre de sélection, un bras mécanique la récupère même si une cellule non cible y est attachée. Le mode « recovery » engendre donc un facteur d'enrichissement pour le poste de collecte de 10.14 ± 5.5 et de 5.5 ± 3.2 pour le réservoir des déchets lors du triage de ces billes fluorescentes.

Triage de billes de 0.2, 0.5 et 1µm

D'autres tests ont été effectués pour le triage. Un nouveau mélange de billes fluorescentes a été trié, mais une taille différente de billes a été ajoutée en plus des billes de 0.5 et 1µm, soit des billes de 0.2µm. Ces billes de 0.2µm se rapprochent encore plus de la taille des bactéries que dans l'expérience précédente avec le mélange de billes de 0.5 et 1µm. Pour le triage de ces trois billes, une différence statistique a été, cette fois-ci, trouvée pour la fraction collectée et pour le réservoir à déchets. Le mode « recovery » semble être le mode encore le plus efficace pour trier.

Le mode « recovery » dont la pureté de la fraction enrichie est maximale (en moyenne pour ces tests de 87%), contrairement à la théorie qui indique que la pureté doit être à son minimum (ce qui peut indiquer un manque d'ajustement du trieur), et que son rendement est maximum (en moyenne pour ces tests de 30%). C'est le mode qui semble le plus approprié pour trier avec le FacsCalibur de Becton Dickinson. Suite à ces résultats, tous les triages cellulaires seront effectués avec le mode « recovery ».

Triage cellulaire de différents mélanges

En utilisant le mode « recovery » et le produit BacLight, différents mélanges de diverses complexités ont été testés pour mesurer la capacité de l'appareil à trier. La diminution du facteur d'enrichissement après le triage cellulaire correspond à une augmentation de la complexité du mélange à trier. Un mélange complexe correspond à une mixture qui contient des cellules très différentes au niveau métabolique mais très semblables au niveau de la taille. Cette caractéristique est observée sur les cytogrammes car toutes les cellules des différentes populations, par exemple les cellules vivantes et mortes, apparaissent dans deux groupes plus ou moins clairement séparés dans un même coin du graphique, tandis que les mélanges moins complexes, comme par exemple les billes de 1 μm et la souche bactérienne *Escherichia coli*, deux populations distinctes, sont visibles sur les cytogrammes. De plus, le facteur minimal d'enrichissement obtenu ici, soit en moyenne de 2 pour les bactéries de milieux naturels, correspond au facteur d'enrichissement trouvé par une équipe française, soit variant entre 3 et 7 (T. Bouvier). Ce taux légèrement plus haut obtenu par l'équipe française est dû à trois principales raisons. Premièrement, ils ont utilisés le colorant Sybr green I contrairement au colorant BacLight ici utilisé, ce qui ne cible pas exactement les mêmes cellules. Deuxièmement, il s'agissait d'échantillons marins qui ne sont pas composés des mêmes espèces que celles présentes en eau douce. Finalement, l'augmentation de leur facteur d'enrichissement a été facilitée car

les cellules de leur échantillon avaient une fluorescence plus élevée, donc elles étaient plus facilement triées par l'appareil car les cellules étaient plus facilement distinctes du bruit de fond (fluorescence plus basse) causé par l'appareil et des colorants. Malgré ces légères différences, leur plus faible facteur d'enrichissement, i.e. trois fois, se situe près de celui obtenu lors de cette étude, soit un enrichissement de deux fois.

La faible facteur d'enrichissement obtenu peut être dû à l'impact du triage sur les cellules. En effet, l'impact du laser et de la pression peuvent aussi causer une sous-estimation du facteur d'enrichissement. Ces facteurs d'enrichissement obtenus sont donc les facteurs minimaux que l'on peut obtenir après le triage cellulaire. En effet, durant le triage, les cellules subissent du stress comme par exemple le laser, qui frappe la cellule, et cela peut causer une baisse de fluorescence (Anonymous, 2004). De plus, la pression forte, présente à l'intérieur des tuyaux de l'appareil, exercée sur les cellules, peut causer l'éclatement de celles-ci. Cet impact sur les cellules a pour conséquence que celles-ci n'apparaissent plus dans les mêmes fenêtres de départ sur les cytoigrammes. C'est donc pourquoi, tous les comptes sont effectués au microscope à épifluorescence car la distinction entre les cellules rouges et vertes se fait plus facilement. Pour le triage cellulaire effectué lors de cette étude et malgré le stress engendré sur les cellules, pour les échantillons d'eau douce triés en utilisant le mode « recovery », on peut estimer que le facteur d'enrichissement des fractions triées se situe entre 2 (minimal pour eau douce) et 13 pour une situation idéale (billes fluorescentes). De plus, la récupération des cellules était en moyenne de 39% et la pureté des échantillons était en moyenne de 58%.

CONCLUSION

Pour conclure, la caractérisation du triage cellulaire, qui est une bonne méthodologie, a permis de démontrer que pour l'étude des bactéries aquatiques le mode « recovery » est le plus efficace parmi tous les modes pour le FACSCalibur. Aussi, plus la complexité d'un mélange augmente et plus le facteur d'enrichissement

diminue. Pour les échantillons de lacs, ce facteur se situe près de deux. En effet, ce taux d'enrichissement est un taux minime car dû aux impacts engendrés par le triage cellulaire (déformation et éclatement des cellules) ce taux peut être sous-estimé. Ce taux se situe probablement entre deux et treize (facteur obtenu lors du triage des billes). De plus, ce facteur d'enrichissement minimal de deux permet le début d'une différenciation entre les populations dans une même communauté.

**CHAPITRE 2 : LA DISTRIBUTION DE LA COMPOSITION
BACTÉRIENNE SELON LEUR ÉTAT MÉTABOLIQUE SOUS FORME
D'ARTICLE SCIENTIFIQUE**

COMMUNITY COMPOSITION OF FRESHWATER BACTERIA IN RELATION
TO METABOLIC STATE

Marie-Noëlle Boivin¹, Paul del Giorgio¹ and Eva Lindström²

¹Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Canada

²Department of Limnology, Uppsala University, Sweden

ABSTRACT

In aquatic ecosystems, the key contributors to the microbial loop and to the cycling of organic carbon are the bacteria. Bacterioplankton are very abundant in freshwater systems and recent advances in molecular methods have revealed their great diversity. A primordial question in microbial ecology is how the diversity of these microorganisms is connected to their metabolic capabilities and to their activity in the environment. In a bacterial community, there is a continuum of physiological states. It is still unclear if these different physiological states are associated to specific taxa or whether the activity is distributed homogeneously among all cells and taxa. The present study explores the connection between the physiological state of individual freshwater bacteria and their phylogenetic composition. We have focused on cells with high and low DNA content and on cells with intact or damaged membranes. These fractions were analyzed by flow cytometry and subsequently physically separated using flow sorting. The resulting samples were concentrated and the DNA extracted, amplified and analyzed using DGGE. The results show that there is a difference in the taxonomic composition between different physiological states, i.e. between live, dead, HNA and LNA fractions. These differences are observed by the absence or presence of bands as well as in changes in the intensity of the DGGE bands. These results suggest that a connection does exist between the physiological state of bacterial cells and the phylogenetic composition in bacterioplankton, which could have implications for the functioning and regulation of these communities.

Keywords:

Cell sorting, bacterioplankton composition, lakes, metabolic states, DGGE

INTRODUCTION

Ecology has focused on scale issues ranging from individual organisms to populations and from communities to ecosystems. With the help of new technologies, these scales have been integrated, for example small organisms can be studied with molecular biology in the same time scale as their ecosystems with physical and chemical tests (Zehr and Voytek, 1999). Two of these techniques used here to study lake bacterioplankton are flow cytometry in combination with sorting, and molecular biology, which includes DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The combination of these techniques allows us to focus on two of the main questions in microbial ecology: Which species of microorganisms contribute to ecosystem functioning? How are species distributed among metabolic states? In fact, a number of studies started to open this black box of microbial communities (Wallner *et al.* 1997; Muyzer and Smalla. 1998; Zubkov *et al.* 2001; Trusova and Gladyshev. 2002). It is necessary to conduct further studies in order to understand the ecological role of known species in a community (Bernard *et al.* 2000). Some questions are beginning to be answered, such as which members of bacterial communities are responsible for the specific activity, overall activity and productivity (Bernard *et al.* 2000) and how nutrient conditions will influence the specific physiological properties of microorganisms (Zehr and Voytek, 1999).

The availability of molecular techniques and cell sorting allows us to address these questions. Flow cytometry allows for the study of different parameters, such as the abundance, the cell size and the biochemical characteristics of a bacterial population (Fuchs *et al.* 2000; Vives-Rego *et al.* 2000). Furthermore, flow cytometry allows physical separation of different types of cells by sorting. For this study, analysis by flow cytometry and cell sorting (switch sorting) were done in order to separate active cells from inactive cells and to separate cells with intact membranes and with damaged membranes. This separation is made possible by the appearance of

cells in distinctly different parts of the cytogram. For this purpose we used two products, BacLight and Syto 13. BacLight is used for the evaluation of the membrane integrity. Syto 13 is a nucleic acid stain that allows discrimination between cells with a high DNA content (HNA), the active fraction of the community and low DNA content (LNA) cells, i.e. the inactive, dead and dormant cells of the community (Lebaron *et al.* 2001).

Furthermore, new molecular techniques allow for the study of genetics, capacities and activities of organisms, both in culture and in the natural environment, at the species and community level (Murrel *et al.* 1998; Muyzer and Small, 1998; Schneegurt and Kulpa, 1998; McCaig *et al.* 199). Using these techniques, questions about evolution, community biogeography, population structure and biodiversity can be addressed. Molecular biology also provides information about gene transfer among microorganisms. Gene transfer has implications for evolution and evolution of new species. Additionally, molecular biology creates an exciting new direction within the field of molecular microbial ecology which uses functional genes as molecular markers to perceive metabolic activity (Muyzer and Smalla, 1998).

Presently, the number of studies of bacterial diversity is growing and forming a new discipline, i.e. molecular microbial ecology (Benlloch *et al.* 1995; Acinas *et al.* 1999). To detect and identify microorganisms, different target genes such as 16S rRNA are used (Muyzer and Smalla, 1998). Both active and inactive microbes contain DNA, but active ones contain more RNA (Hobbie *et al.* 1977; Lee and Kemp, 1994; Lebaron *et al.* 1998). Thus, there is a relationship between the metabolic activity and the content of rRNA (MacGregor, 1999). Therefore DNA can be used for studies of structures of whole communities (Bernard *et al.* 2001; Simek *et al.* 2001), while RNA can be used for studies of the active fraction (Lee and Kemp, 1994).

Today, with multiple studies, we also know that there is a certain heterogeneity in a community, i.e. different metabolic states exist simultaneously in a natural community (Bernard *et al.* 2000; Bernard *et al.* 2000; Bernard *et al.* 20001; Servais *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002). Studies have shown, for example, that

HNA cells contribute from 77% to 100% of the total biomass production and the LNA cells from 5% to 20% of the total biomass production (Lebaron *et al.* 2001; Zubkov *et al.* 2001). Furthermore, HNA cells are the dynamic component of the community and the LNA cells seem to be the inactive or dead cells (Lebaron *et al.* 2001; Zubkov *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002). These metabolic states are influenced by the environment. In fact, the mean specific activity of bacteria varies largely depending on the trophic status (Lebaron *et al.* 2002). Also, water chemistry, environmental variables and input from neighboring lakes will influence bacterial abundance, activity (metabolic states) and diversity (Méthé and Zehr, 1999; Lindström, 2001; Lindström and Bergström, 2004).

The aim of our study was to investigate if freshwater bacteria differ in composition according to their metabolic group, i.e. the high DNA content cells, low DNA content cells, cells with intact (live cells) or damaged membrane (dead cells), and what it can tell us about their function in the environment. The hypothesis of this study explored the possible connection between the physiological states of bacterial cells and the phylogenetic composition of bacterioplankton. This connection would have implications for the functioning and regulation of these communities, for example, in terms of selective activation, inactivation and mortality in natural microbial communities. We will focus on lakes and rivers in Estrie (Quebec, Canada) ranging in status from oligotrophic to eutrophic. The principal questions are: 1) Is there a difference in bacterial composition between different metabolic states? 2) How are the fractions distributed and connected to each other on the basis of their bacterial composition? 3) How does the composition of one lake differ relative to the composition of the bulk from all other lakes?

MATERIALS AND METHODS

Sampling site

Sampling was carried out during the summer of 2004 in Southern Quebec. Seven lakes and two rivers were sampled (fig 2.1). These lakes have different trophic status and the rivers allows the comparison with their respective lakes (table 2.1). Integrated epilimnetic samples were taken by filling up three bottles of 500ml for each lake and river and sampling was always conducted in the morning.

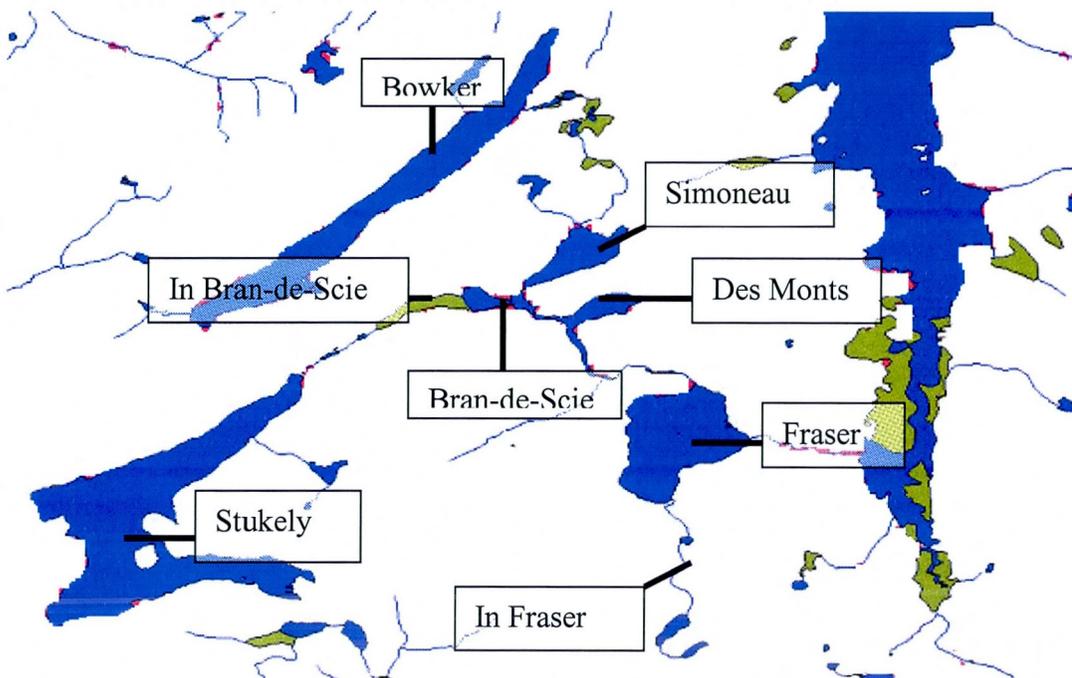


Figure 2.1 Lakes and rivers studied in Estrie (Brome is not illustrated)

Table 2.1 The sampled lakes and rivers and their trophic status

LAKES / RIVERS	CHLOROPHYLL ($\mu\text{g/l}$)	DOC (mg/l)	TP ($\mu\text{g/l}$)	TROPHIC STATUS
Des Monts	4.16	5.741	10.15	Mesotrophic
Brome	5.74	3.410	16.48	Mesotrophic
Simoneau	1.96	4.507	9.29	Mesotrophic
Stukely	1.90	4.152	5.67	Oligotrophic
Bran-de-Scie	6.45	6.142	19.93	Eutrophic
Fraser	6.92	5.934	11.16	Mesotrophic
Rivière Fraser (In)	-	6.100	-	-
Bowker	1.96	2.758	5.78	Oligotrophic
Rivière Bran-de-Scie (In)	-	4.901	10.64	-

Filtration of bulk water samples for DNA extraction

Three samples of 500 milliliters each of bulk lake water were filtered onto a sterivex cartridge (Millipore) with a pore size of $0.22\mu\text{m}$ using a peristaltic pump at a speed of 100ml/min.

Preparation of sheath fluid for flow cytometry

Nanopure water was filtered twice through a Millipore tangential cartridge (300K), and thereafter sterilized by autoclaving for 30 minutes at 121°C . The water was stored at room temperature in sterile acid washed erlenmeyer flasks. This water was used as sheath fluid for the sample in the cytometer.

Flow cytometry

Non-filtered samples of 0.5 ml of lake water were stained with $1.5\mu\text{l}$ of LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes) at a concentration of $0.5\mu\text{M}$ and incubated for 10 minutes in the dark. The samples were run through in a

FACSCalibur flow cytometer. Green fluorescent beads of (1 μm in diameter) were added as an internal standard to each sample at a final concentration of $5,6 \cdot 10^4$ beads/ml. Each sample was analyzed with respect to its red and green fluorescence in order to distinguish between live and dead cells.

Separate subsamples were stained with Syto 13 (Molecular Probes). Syto 13 was added to a final concentration of 0.5 mM, and the samples were incubated for 5 minutes in the dark. Beads were also added as an internal standard, as described above. The Syto 13 stained samples were analysed with respect to green fluorescence and side scatter (SSC) in order to distinguish between high DNA content cells and low DNA content cells. The windows created in the cytogram to distinguish between two populations were made arbitrarily where the two main concentrations of dots were seen.

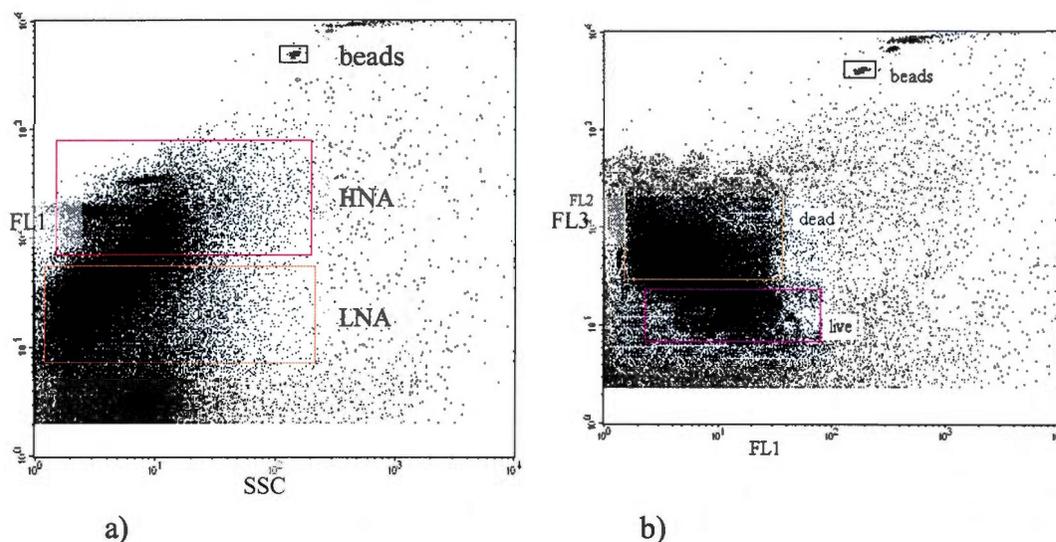


Fig. 2.2 Cytogram of a freshwater sample (lake Fraser) stained with a) Syto 13 and b) BacLight

Cell sorting

Cell sorting was done mechanically using a FACSCalibur in recovery mode. The target cells for sorting were the live, dead, high DNA content (HNA) and low DNA content (LNA) cells (fig. 2.2). The target fraction was collected in 50ml centrifuge tube where we collected between 400 and 1000 milliliters after a minimal 2×10^6 cells were sorted. The remaining sample was sent to the cytometer's waste container and between 1000 and 2000 milliliters were collected for further analysis. The recovery mode (maximum of purity between the three modes, maximum of efficiency between the three modes) was used. Between 1.9×10^6 and 2.5×10^6 cells were sorted at a sort rate of between 150 and 650 cells/second depending on the sample. It takes between 1 hour to 3 hours to sort the sample. The sorting window was created for each sample, i.e. depending how the two main fractions was distributed in the cytogram.

Epifluorescence microscopy

Microscopy was used for counting cells in order to determine the enrichment factor, which cannot be done with the cytometer as the sorted cells do not appear in the same area of the window as in the first run. From each sorted sample 40 ml were filtered onto a white membrane filter (pore size $0.2 \mu\text{m}$). From the bulk samples, 5ml were filtrated in the same way. These samples were counted with an epifluorescence microscope (Olympus BX51). For the Syto 13, the fluorochrome was excited at 488nm and the fluorescence was emitted at 509 nm (Anonymous, 2003) and for the Baclight, the Syto 9 was excited at 480nm and it was emitted at 500nm and the propidium iodide was excited at 490nm and the fluorescence was emitted at 635nm (Anonymous, 2004). For the bulk samples, five grids were counted, but for the sorted samples, 40 grids were counted. For each sample, three replicates were done.

Filtration of sorted cells for DNA extraction

The samples containing sorted cells (collected or waste), were filtered through a sterivex, 0.22 μ m (Millipore) capsule, in the same manner as the bulk samples (see above). Both the collected and the waste fractions were used for the comparison of the two fractions. All samples were stored at -80°C .

DNA extraction

DNA extraction was done with the DNeasy tissue kit (Qiagen) following the protocol for gram positive bacteria (Anonymous, 2004). Due to the difficulty encountered in the recuperation of DNA from gram positive bacteria, using this protocol ensured that all the bacteria were extracted. The protocol used was that described by the manufacturer with the following modifications: we doubled the amount of lysis buffer (Tris-HCl, EDTA, Triton X and lysozyme), relative to the amount proposed by Qiagen and pipetted it into the Sterivex, and the whole filter was incubated at 37°C for 45 minutes in hybridization oven. Thereafter, lysis with proteinase K and buffer AL (double the amount) was performed at 70°C for 45 minutes, also in the hybridization oven. The extracted DNA was diluted in approximately in 200 μ l of pre-prepared commercial buffer and stored at -80°C .

Polymerase chain reaction (PCR)

All PCR components (Qiagen) were mixed as described by the manufacturer including 50 pmole of each primer, 358f (Sigma, PAGE purification, with GC clamp) and 907R (Sigma, PAGE purification) per 50 μ l reaction (Muyzer *et al.* 1995). The concentration of MgCl_2 was increased to 3 mM (final) in order to increase the yield of PCR product (Lindström, 1998). 30 μ l of the solution containing the environmental DNA, between 2ng and 1261.5ng, was added to each sample. For each PCR run, a negative control (sterile water) and a positive control (*Staphylococcus epidermidis* or a Betaproteobacteria coming from Dr. Martin Hahn at the Austrian Academy of

Sciences in Mondsee, Austria) was included. PCR was run in a PCRiCycle (Bio-Rad) instrument. To check the effectiveness of the PCR reaction, 5 μ l of each sample were run on a 90% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide (5 mg/ml). 1 μ l of a DNA ladder (Invitrogen) was run in parallel to the samples, to verify that the obtained PCR products were of the right length. The agarose gel was run for 40 minutes at 100 V. Then the gel was visualized in an UV chamber and analyzed using the software Quantity One (Bio-Rad).

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

DGGE was performed in a gradient between 40 and 70% denaturant (protocol established by our laboratory). The gels polymerized for at least 2 hours and were run in the Dcode system (Bio-Rad) at 80V for 16 to 17 hours at 60°C. 40 μ l of each PCR product was loaded in the gels. The gels were stained with Sybr Gold (Molecular Probes) for 1 hour and visualized in an UV chamber. The gels were analysed using the Quantity One software. This software allowed us to visualize the bands on a gel. Furthermore, with this software, a band in a profile can be easily match up with its counterpart in another profile. All the bands were then given a relative intensity which we then used in further analysis.

Analysis

The analysis of the different DGGE profiles was done with the JMP software. The cluster analysis was used combined with the Ward's method and all the data were standardized, i.e. the relative intensities (fluorescence) of the bands were used and cut from the background intensity. The analysis takes into consideration the presence and absence of the bands and the relative intensity. The resulting dendrogram quantifies the similarity between the different fractions, with those closer together being more similar. Two additional indices were used: the Shannon-Weiner index and the Sorensen's index. The diversity index was calculated using the number of species (band number) and the relative abundance of each band (intensity

of the band). The diversity index is based on the Shannon-Weiner index shown in the figure 2.3 (Ricklefs and Miller, 2005).

$$H = -\sum p_i \log_e p_i$$

p_i : relative abundance of each band taking to account the number of species (number of bands)

Fig. 2.3 The diversity index (H)

Also, the Sorensen's index was used (fig.2.4). The Sorensen's index is a similarity index between two samples. An index of 0 indicates a complete difference between two samples and 1 indicates a perfect similarity (Murray *et al.* 1996).

$$C_s = 2j / (a+b)$$

j : common bands between the two profiles in sample A and B
 a : number of bands in sample A
 b : number of bands in sample B

Fig. 2.4 Sorensen's index

To compare the Shannon-Wiener index and the Sorensen index between each lake and fractions, ANOVA's were performed with the JMP version 5.0 software.

RESULTS

Table 2.2 Chemical and physical data from the sampled lakes and rivers

Lakes	Chlorophyll <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)	TN (mg/L)	TP ($\mu\text{g/L}$)	DOC (mg/L)	BA (10^6bact/ml)	HNA %	Live %
Brome	5.74	0.292	16.49	3.41	2.4	61	46
Bowker	1.96	0.104	5.78	2.76	5.0	55	51
Des Monts	4.16	0.333	10.15	5.74	4.5	60	55
Simoneau	1.96	0.209	9.30	4.51	7.0	61	52
Stukely	1.90	0.263	5.67	4.15	1.9	66	56
Bran-de- Scie	6.45	0.236	19.93	6.14	8.7	66	47
Fraser	6.92	0.279	11.16	5.93	5.5	53	51
In Fraser	-	-	-	6.10	7.1	70	51
In Bran- de-Scie	-	0.270	10.64	4.90	1.3	67	51

The table 2.2 shows nutrient, chlorophyll and bacterial abundance data for the study lakes. Lakes Stukely and Bowker are oligotrophic due to the low concentration of chlorophyll *a* and phosphorus. Des Monts, Brome, Simoneau and Fraser are mesotrophic. Finally, the lake Bran-de-Scie is eutrophic due to the highest chlorophyll *a* concentration and an elevated phosphorus concentration.

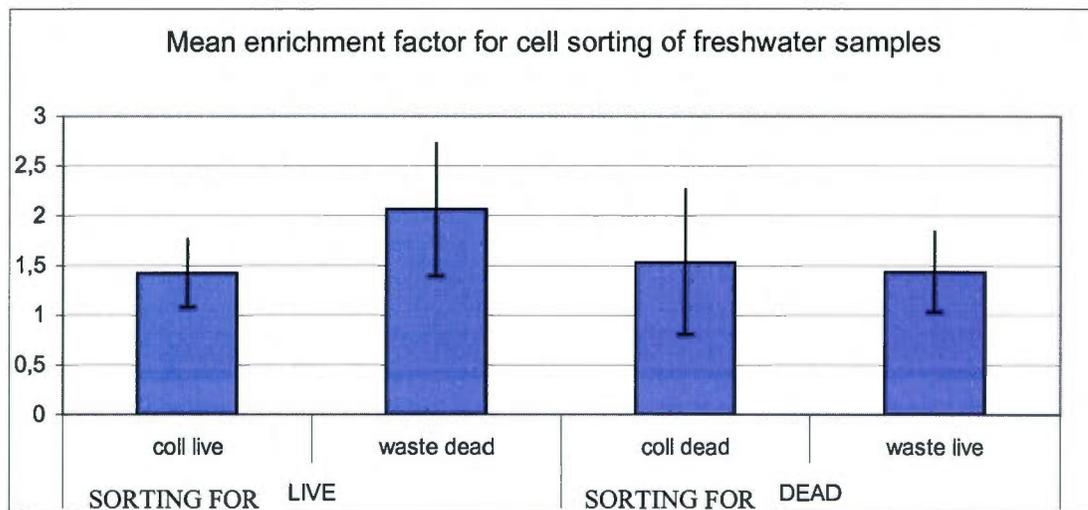


Fig 2.5 Mean enrichment factor for cell sorting of freshwater samples (sorting for live and dead cells)

Table 2.3 Comparison of the purity of the live and dead cells in the bulk and the collected fractions live and dead for each lake

Lakes	% Live (before sorting)	% Live collected Live (after sorting)	% Live collected Dead (after sorting)
Brome	46	61	42
Bowker	51	69	46
Des Monts	55	59	43
Simoneau	52	61	46
Stukely	56	58	43
Bran-de-Scie	47	60	45
Fraser	51	61	47
In Fraser	51	53	41
In Bran-de-Scie	51	60	48

For the sorting experiment of lake samples (table 2.3), the enrichment factor for the collected and waste fractions ranged from 0.75 to 2.75. This factor was

determined by the ratio of live and dead cells (green and red bacteria) under the epifluorescent microscope. Table 2.4 shows the change in the purity of the live and dead cells for each lake. Prior to sorting, the purity was between 46 to 56 % of live cells and 44 to 54% for the dead cells in the bulk samples. After the sorting of live cells, the purity varied between 53 to 69% and for the sorting of the dead cells, the purity varied between 52 to 59%. The purity of the sample increased between 5 and 13 % for the lake samples (live and dead cells) with a basal enrichment factor near 2.

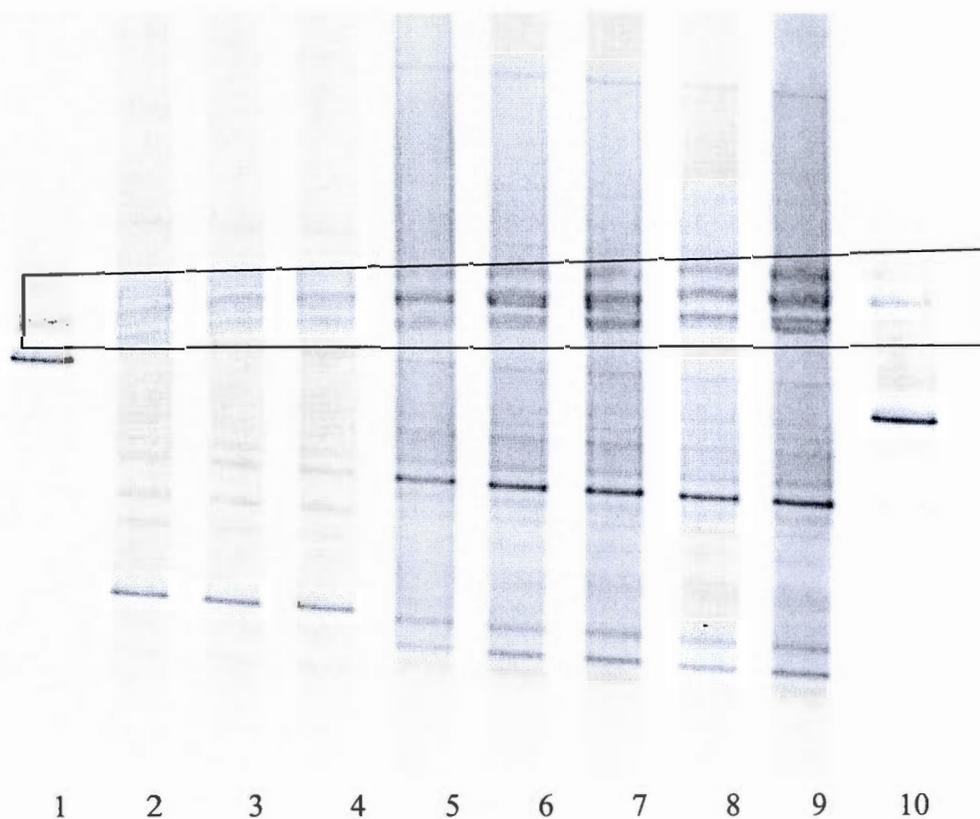


Fig. 2.6 Control samples of the DNA extraction and PCR reaction (1. Beta – positive control, 2. Inlet Bran-de-Scie old, 3. Inlet Bran-de-Scie #1, 4. Inlet Bran-de-Scie #2, 5. Simoneau old, 6. Simoneau #1, 7. Simoneau #2, 8. Simoneau 1''PCR, 9. Simoneau 1''PCR and 10. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands.

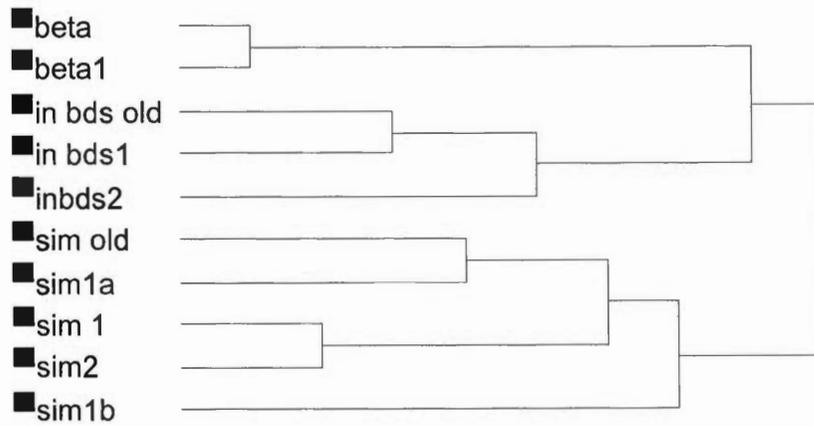


Fig. 2.7 Cluster analysis of the control of the DNA extraction and the PCR reaction

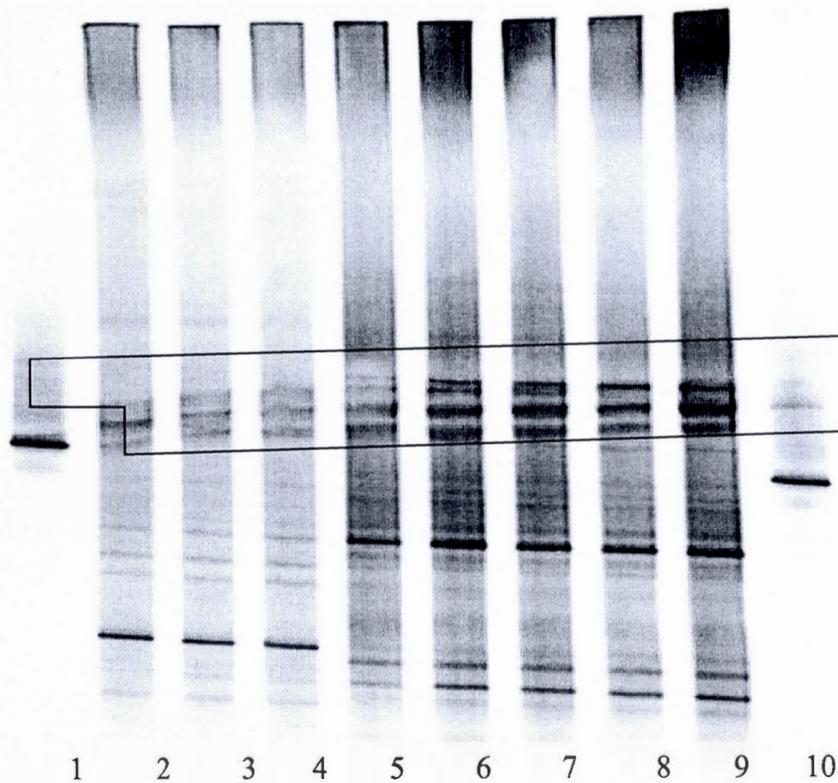


Fig. 2.8 Control samples of the replication of DGGE (1. Beta – positive control, 2. Inlet Bran-de-Scie old, 3. Inlet Bran-de-Scie 1, 4. Inlet Bran-de-Scie 2, 5. Simoneau old, 6. Simoneau 1, 7. Simoneau 2, 8. Simoneau 1'PCR, 9. Simoneau 1''PCR and 10. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands.

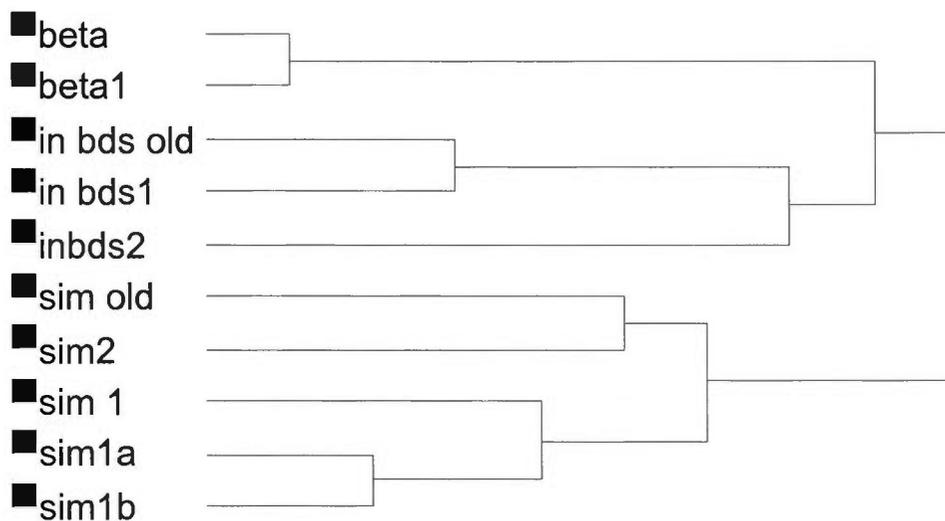


Fig. 2.9 Cluster analysis of the control of the DGGE replication

The robustness of DNA extraction, PCR and DGGE protocols was tested to make sure the resulting DNA was useful and comparable throughout time and between different experiments. Figures 2.6 and 2.7 show the replication of the DNA extraction and the PCR reaction. Two samples were used to test the replication of extraction (inlet Bran-de-Scie #1 and #2 and Simoneau #1 and #2). Two new extractions of the two samples were performed, each coming from separate sterivex capsules, these were then compared to an older extraction from each lake (inlet Bran-de-Scie old and Simoneau old). The resulting profiles were closely related. The replicability of the PCR reaction was also tested using a sample from lake Simoneau. From the same DNA extract, two different PCR reactions were carried out (Simoneau 1a and Simoneau 1b). These replicated PCR products were found closely associated in the cluster. The DGGE replication is shown in figures 2.8 and 2.9. The resulting cluster showed that there was no difference between these profiles and the profiles shown in figures 2.6 and 2.7. Inlet of Bran-de-Scie and Lake Simoneau were still in the same cluster, closely related. These results imply that each method, DNA

extraction, PCR and DGGE are reliable to allow comparisons between samples. The phantom bands were present in all DGGE profiles. These bands were excluded in all further analysis. These phantom bands were probably caused by primer fragment that were amplified during PCR.

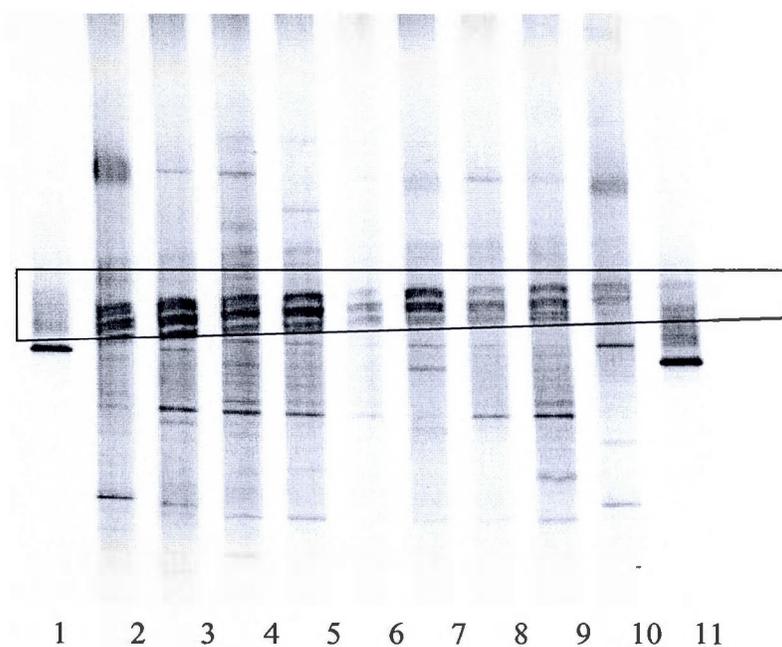


Fig. 2.10 Bulk water samples from different lakes (1. Beta – positive control, 2. Inlet Bran-de-Scie, 3. Brome, 4. Simoneau, 5. Stukely, 6. Des Monts, 7. Bran-de-Scie, 8. Fraser, 9. Bowker, 10. Inlet Fraser, 11. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and were eliminated from the analyses.

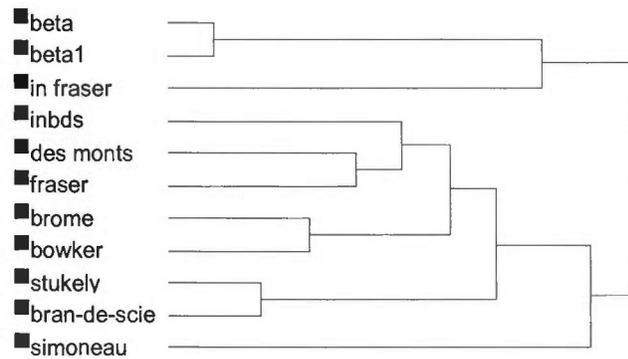


Fig. 2.11 Cluster analysis for the bulk sample of all lakes

For the comparison of all the DGGE profiles and their cluster analysis, the bulk water profile and cluster will be used as a base, as shown in figures 2.10 and 2.11. This cluster analysis showed a strong geographical link between the lakes and the rivers, more than a trophic status link. For example, Bowker and Stukely, both oligotrophic lakes, were not closely linked in the DGGE profiles.

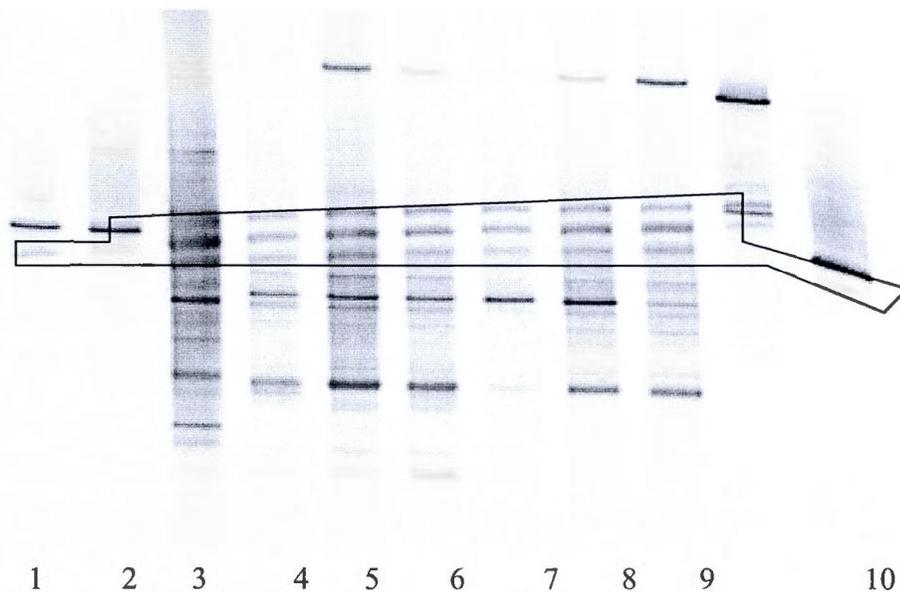


Fig 2.12 Lake Bowker and its sorted fractions (1. and 2. Beta – positive control, 3. Bulk, 4. Collect live, 5. Waste dead, 6. Collect dead, 7. Collect HNA, 8. Waste LNA, 9. Collect LNA, 10. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

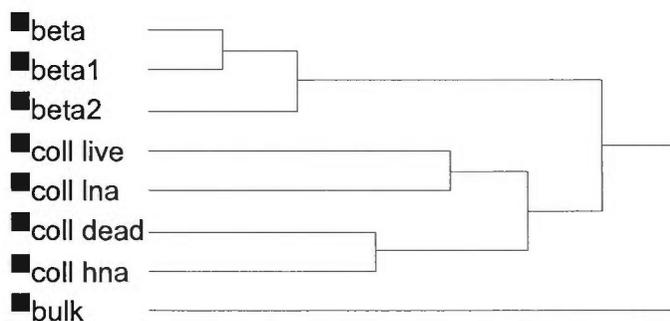


Fig. 2.13 Cluster analysis of the lake Bowker and its sorted fractions

Figures 2.12 and 2.13 show the analysis for lake Bowker and its sorted fractions. The bulk sample appears in a separate cluster suggesting that it differed from the different fractions obtained by cell sorting. The collect live fraction was closely similar to the collect LNA fraction and the collect dead was closely related to the collect HNA fraction. This was an example of one lake and its sorted fractions, the other lakes can be found in the annex I.

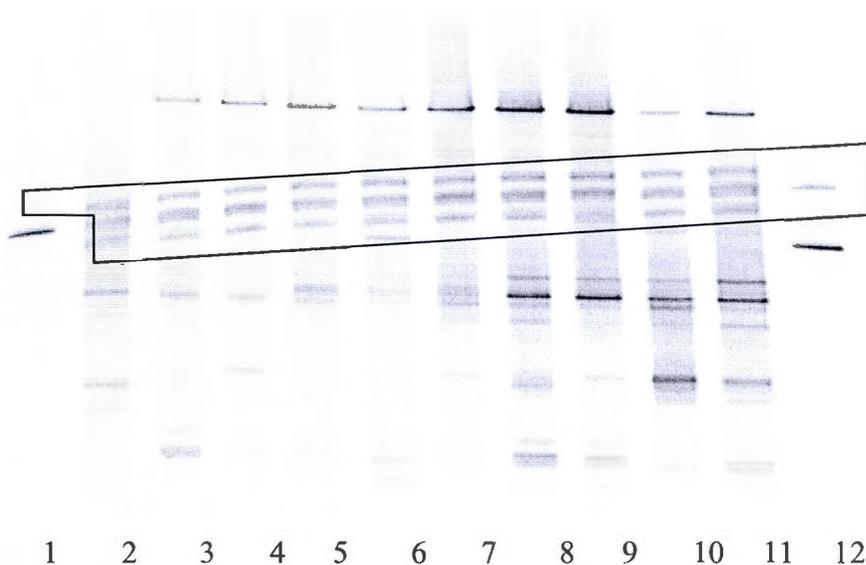


Fig. 2.14 Comparison between the different fractions collect live from the different sample lakes (1. Beta – positive control, 2. Mix, 3. Brome, 4. Simoneau, 5. Stukely, 6. Des Monts, 7. Bran-de-Scie, 8. Fraser, 9. Inlet Fraser, 10. Bowker, 11. Inlet Bran-de-Scie, 12. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

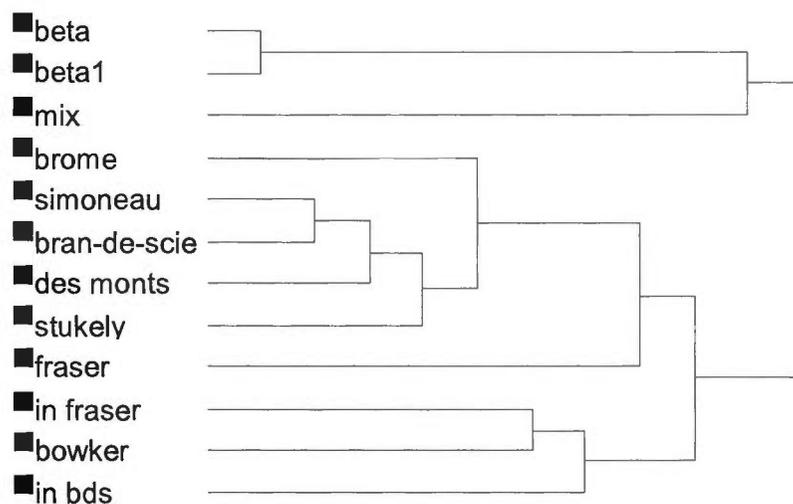


Fig. 2.15 Cluster analysis of all the fractions from the collect live from all the lakes

Figures 2.14 and 2.15 show a comparison between the different collect live fractions from all the lake and river samples. This clustering also reflected the geographical link, i.e. the closer the lakes were, the closer they were linked together in the DGGE profile, between the lakes and rivers and not the trophic status. In addition, the cluster was different from the one obtained using bulk samples. The only relation that was still there, is between lake Stukely and Bran-de-Scie, but the distance between Stukely and Bran-de-Scie had increased. The other cluster analysis, i.e. collect dead, HNA and LNA are in annex I.

The next step taken was to analyze and compare band pattern (presence, absence and relative intensity) based on mean band number, similarity, diversity index and Sorensen index to see if other relationships can be found in a deeper analysis.

Table 2.4 Mean number of bands for each DGGE profile (sorted lake contain the four sorted fraction: live, dead, HNA and LNA)

Lakes	Mean band number	Standard deviation
Bulk (all the lakes in the same gel)	15	4
Coll live (all the lakes in the same gel)	16	2
Coll dead (all the lakes in the same gel)	13	4
Coll HNA (all the lakes in the same gel)	13	4
Coll LNA (all the lakes in the same gel)	12	3
Bowker sorted	10	2
Bran-de-Scie sorted	11	2
Brome sorted	8	5
Des Monts sorted	11	3
Fraser sorted	10	1
In Bran-de-Scie sorted	12	3
In Fraser sorted	11	3
Simoneau sorted	9	4
Stukely sorted	11	1

The number of bands was counted in each column of a DGGE profile. The mean, i.e. the average number of bands in one DGGE profile for all the column, was taken to allow for a comparison between the samples (shown in table 2.5). The mean number of bands was similar between bulk and sorted samples. The lakes and their fractions had also a similar mean number of bands. So, this means that similar number of dominant species appear in all the DGGE profiles.

Table 2.5 Diversity index of the lakes based on the DGGE profile (sorted lakes contain the four sorted fractions: live, dead, HNA and LNA)

Lakes	H mean	Standard deviation
Bulk (all the lakes in the same gel)	2.59	0.29
Coll live (all the lakes in the same gel)	2.65	0.11
Coll dead (all the lakes in the same gel)	2.40	0.37
Coll HNA (all the lakes in the same gel)	2.39	0.29
Coll LNA (all the lakes in the same gel)	2.42	0.27
Bowker sorted	2.22	0.23
Bran-de-Scie sorted	1.98	0.26
Brome sorted	2.06	0.52
Des Monts sorted	2.44	0.22
Fraser sorted	2.23	0.11
In Bran-de-Scie sorted	2.47	0.23
In Fraser sorted	2.42	0.27
Simoneau sorted	2.01	0.53
Stukely sorted	2.39	0.16

The diversity index was calculated for each column of a DGGE profile. The mean, i.e. the average diversity index in one DGGE profile for all the column, was taken to allow for a comparison between the samples (shown in table 2.6). The mean diversity index was similar between the bulk and the sorted samples. This shows that the diversity is similar in all the DGGE profiles.

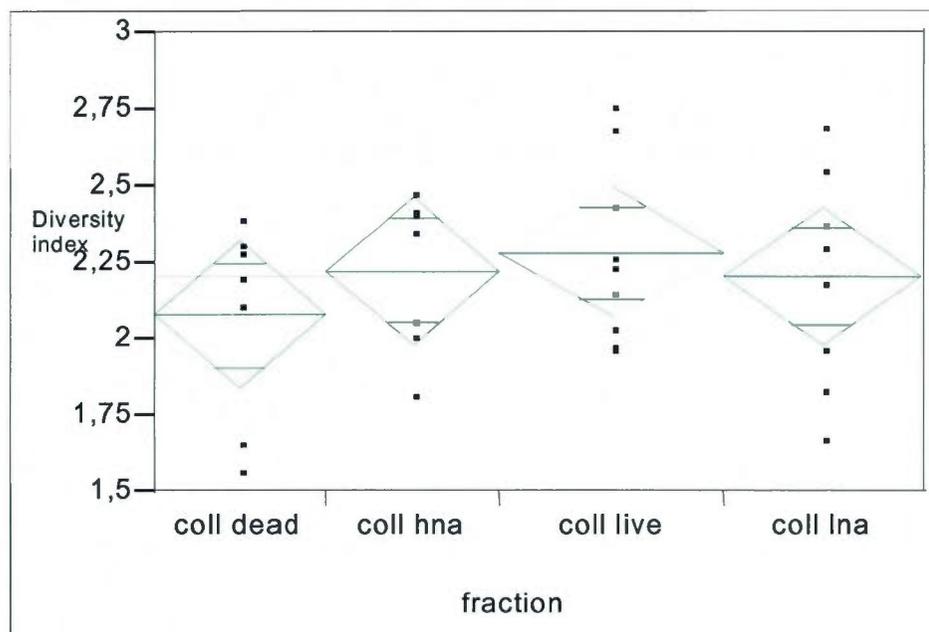


Fig.2.16. Mean and standard deviation of the diversity of each sorted fraction from all lakes (i.e. the collected dead contained all the lakes that we had profiles and they all came from different DGGE)

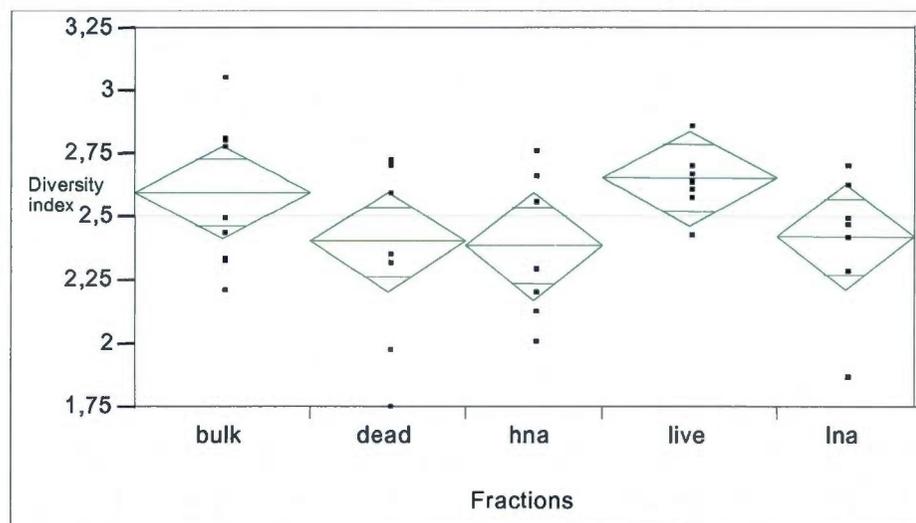


Fig. 2.17 Mean and standard deviation for the diversity of the collected fractions (in a same gel, i.e all the collected live or dead or HNA or LNA were put in the same DGGE profile) and the bulk

The figures 2.16 and 2.17 show no significant difference between the collected fractions of each lake (different gel) and the bulk and the collected fractions (in each lake) in a same gel ($P > 0.6292$ and $P > 0.1799$ respectively). In both cases, the live fraction had a tendency to have a diversity index higher than the other fractions which could mean that the live fractions contain the majority of the species compared to the other fractions.

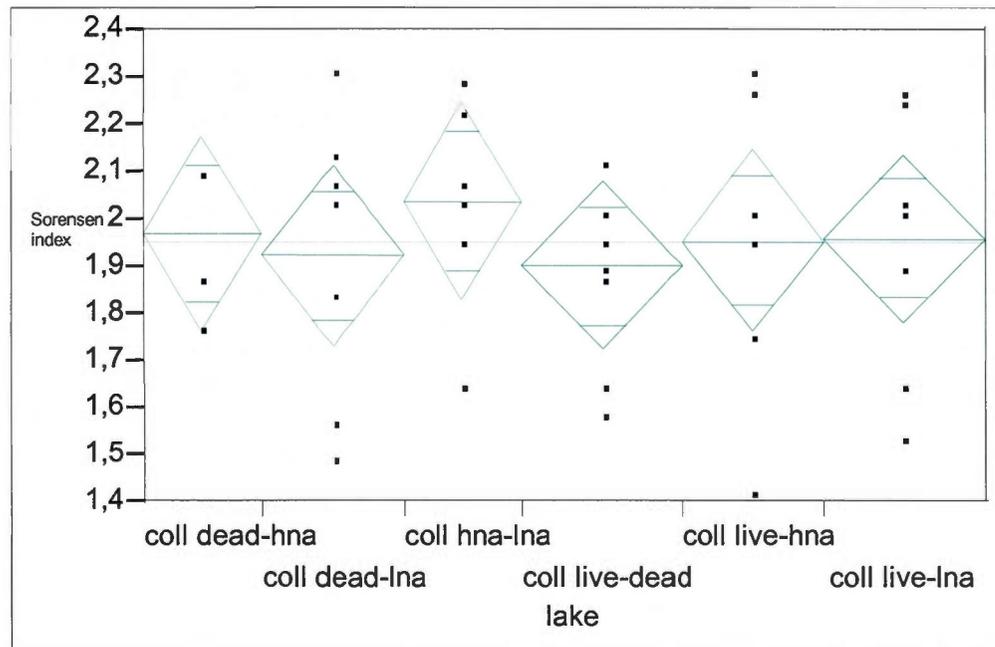


Fig. 2.18 Mean and standard deviation of the Sorensen index (similarity value) for the sorted fractions for each lakes by looking at the presence and absence of the bands

In this analysis (fig 2.18), each sorted fraction was compared to all other fractions to quantify the similarity between them based on the presence and absence of bands. Figure 2.18 shows no statistically significant difference ($P > 0.9437$) between the similarity values which means that all groups of two compared fractions were similar. The data was transformed (e^n) to achieve normal distribution of the residuals prior to analysis.



Fig. 2.19 Mean and standard deviation on the similarity for each group of sorted fractions from all lakes according to the relative intensity of each bands

The similarity value used here was based on the intensity of each band. Figure 2.19 shows that there was no statistically significant difference ($P > 0.4632$) between the different fractions, but the dead and HNA had a similarity higher than the others and the live-LNA group had the lowest similarity value. The lowest similarity value for the live-LNA group means that they were constituted from the majority of the species (a lot of different species, so low similarity) present in a community and the highest similarity value for the dead-HNA group means that only a few similar species (high similarity) was shared between this group since by the Sorensen's index, the lower is the index the more different are the fractions and the higher is the index the more similar are the fractions.

DISCUSSION

Cell Sorting

The enrichment of our target communities was around 2 with an augmentation in the purity of between 5 and 13%. This enrichment factor for this case (lake water) was at its minimum because cells can explode or be distorted when passing through all the tubing of the cytometer, they are put under the pressure of the cytometer and finally the laser can change the conformation of the bacteria (Nebe-von-Caron *et al.* 2000). So, if all the cells undergo all this pressure and distortion, the enrichment factor will be lower than expected. In reality, the enrichment must be situated between 2 and 13, where 13 is the maximum of an enrichment factor that we can obtain for an “ideal” case, i.e. the sorting of beads (0.2, 0.5 and 1 μ m). This is an “ideal” case because the beads are not destroyed or distorted by the laser and the pressure in the cytometer and the fluorescence is not affected after the sorting (Schwartz, 1998). Even if it was a low and minimal enrichment factor, a separation between our fraction was observed under the microscope.

This low enrichment factor can be explained by many factors. First, the target fractions (i.e. the bacteria in different metabolic states) appeared close to each other in the cytogram with no clear separation between them. Thus, close to the edges of the target regions selected there could be a mixture of both cell types, which could be sorted into either fraction. When we sorted beads of 1 μ m and a bacterial strain, *Escherichia coli* in a previous experiment, we obtained an enrichment factor of 10 (data not shown here). These two fractions were more clearly separated in the cytogram than the different metabolic groups in our lake samples. Thus, this could be a problem of clearly defining the different target populations based on the criteria chosen. The target groups used in this study were the best we can define taking in consideration the cytometer, the dye and the time that we had. Further, the small size of the bacteria make it difficult to sort one cell at a time by the switch sorting,

because many cells can clump together. The enrichment factor can also be underestimated due to the bursting of cells during their transport through the cytometer due to the constant pressure in the system and the great distance of tubing they have to go through.

Bulk sample composition

The clustering of the bulk lake samples was compared with the geographical distribution and the trophic status of the lakes. The major connection between the lakes was a geographical link as shown in other studies (McArthur *et al.* 1992; Dumestre *et al.* 2002; Polymenakou *et al.* 2005). The geographical connection exists between Des Monts and Fraser, Stukely and Bran-de-Scie. Furthermore, an indirect geographical link was observed between the inlet of Bran-de-Scie and lakes Des Monts and Fraser because to join them, the inlet has to pass through lake Bran-de-Scie. The inlet of Fraser was not connected to any particular lake because a small quantity of DNA was obtained, so only a few bands could be observed. Simoneau joined mostly at the end all the other lakes and rivers even if in reality Simoneau is connected to Bran-de-Scie and Des Monts and indirectly linked to Bowker via a series of marshes.

For the trophic status, the only relation observed was between Des Monts and Fraser which are mesotrophic lakes. The two oligotrophic lakes, Bowker and Stukely, are not connected together, in fact Stukely is connected with an eutrophic lake, Bran-de-Scie. The other mesotrophic lakes, Brome and Simoneau are not related together. No other studies seem to show that the trophic status may play a role in the bacterial composition (Lindström, 2000; Yannarell *et al.* 2003). So, for the bulk composition of the lakes from Estrie, the geographical distribution seems to explain better the clustering of the lakes after the DGGE profile than the trophic status. That implies that the connectivity between lakes allows to conserve the majority of the species even with the different physical and chemical conditions of the lakes.

Live vs HNA and dead vs LNA

Our first hypothesis was that there should be a relationship between the live fraction and the HNA (high DNA content) fraction. Live cells should contain more DNA since they contribute to the biomass production and the cellular replication to a greater extent than other cells do. (Lebaron *et al.*, 2001), i.e. they should be HNA cells. It has been shown that HNA cells have a faster growth, they are intact cells, possess a high content in RNA and possess also multiple copies of the genome (Zubkov *et al.* 2001). Our second hypothesis was that the dead fraction should resemble the LNA (low DNA content) fraction. The dead cells have a damaged membrane and the LNA cells seem to be inactive or dead cells, they are not responding to environmental changes due to their dormancy, they have a damaged membrane and degraded DNA (Lebaron *et al.*, 2001 and 2002). The differences between these four groups can be explained by the different conditions present in the lakes and rivers as for the DOC concentration, the total phosphorus, the total nitrogen and the amount of chlorophyll. In fact, several lake studies shown that the increase of a substrate or DOC concentration seem to increase the bacterial growth and by consequence increase the active / HNA fractions present in a lake (Lindström, 2000; Muylaert *et al.* 2002; Eiler *et al.* 2003; Horner-Devine *et al.* 2003; Wetz and Wheeler, 2004). These factors explain why different species are in the live, dead, HNA or LNA fractions. Our observations did not confirm these two hypothesis.

Lakes and their sorted fractions

Before discussing the results, the phantom bands that we obtained in all the experiments must be discussed. The presence of the phantom bands caused a difficulty since they mask some bands in the DGGE profiles. These phantom bands and the region around them were not taken in consideration in the analysis. The phantom bands might be caused, during the PCR reaction, by an amplification of a loose part of the GC clamp primer or of partial strand of DNA attach to the primers. Also repeated thaws can cause this degradation of the GC clamp (Muyzer and Smalla,

1998; Ishii and Fukui, 2001). Therefore, the relationships that we found could have a higher significance if no bands had been present.

There was similar number of bands in all the lakes and their sorted fractions. The mean number of bands was similar suggesting that all the lakes shared a similar number of dominant species. In addition, the mean diversity index was similar among samples and there was no significant difference between fractions although the live fraction had a diversity index that was consistently higher, suggesting that they contain an higher number of pre-dominant species or a greater species evenness.

The cluster analysis shows that in five of the nine lakes and rivers studied, the live and LNA fractions were connected together and the HNA and the dead fractions were also linked. It was in contrast to our hypothesis, i.e. if HNA are the dynamic members of the community, then they should be associated with the live cells whereas if the LNA are inactive, dormant or maybe dead cells they should be associate to dead cells (Bernard *et al.* 2000; Lebaron *et al.* 2001; Lebaron *et al.* 2002). However, the results of this study follow the study by Zubkov *et al.* (2001) who demonstrated that the LNA group might not be composed of totally inactive cells, but rather should be considered cells that are not as active as the HNA. That can explain why we found that the LNA cells were linked to the live cells, since the live cells are part of the active member of the community (Gasol *et al.* 1999). Furthermore, we found that different combinations of fractions had no significant difference in terms of their similarity (bands and intensity), but the pair dead-HNA, had a higher similarity than all the rest. Based on our results, we formulate a new hypothesis that the dead fractions are the result of grazing and of attack by viruses on the HNA fraction. The live and the LNA fractions are then a bacterial reservoir in the lakes. Lysis by virus and protists grazing are a major cause of bacterial mortality (Simek *et al.* 1997; Weinbauer and Höfle, 1998). The shape, the size, the surface-specific properties and the cell wall of bacteria play an important role in the selection of the bacterial prey and thus result in different mortalities of bacterial morphotypes and genotypes (Simerk *et al.* 1997). For example, heterotrophic flagellates preferably

feed on growing bacterial cells (Pernthaler *et al.* 1997) and *C. glaucoma* and other ciliates remove the most active bacteria (HNA) (Tadonl  k   *et al.* 2005). It has been shown that the selective grazing of rapidly growing and larger cells allows small cells to escape predation and persist in bacterioplankton assemblages (Sommaruga and Psenner, 1995; Simek *et al.* 1997; Posch *et al.* 1997; Massana and J  rgens, 2003). Also, Simek *et al.* (2001) have shown that viral concentration and the frequency of infected cells were highly significantly correlated with grazing rates, thus suggesting that protistan grazing may stimulate viral activity. This information leads us believe that the HNA (active, growing more rapidly) are more readily attacked by the virus and the protozoa than the other fractions and this generates dead cells due to the lysis and digestion of the HNA cells by the protozoa. The LNA cells, perhaps due to their smaller size and other cellular characteristics are protected from mortality.

Bulk vs the specific fractions (live, dead, HNA and LNA)

The cluster from the bulk samples was not reflected in the other fractions (coll live, coll dead, coll HNA and coll LNA), so, certain species might be predominant in the collected fractions. Since none of the fractions resembled the bulk sample, a comparison was made between the specific collected fractions. The cluster analysis revealed that the HNA and dead cells of different lakes mostly resembled each other as for the live and LNA fractions. This can be explained by the fact that the HNA cells, in general, generate dead cells through grazing or by virus attack and the live and LNA function act as a reservoir, i.e. a constant pool of bacteria that keep the community stable by replacing dying bacteria by the same and active bacteria whom were kept in "inactive" form in this pool. These relations (dead and HNA and live-LNA) was both shown at the smaller (in a lake) and larger scale (between lakes) which means that this connection between metabolic states is constant through out the environment and if a change should happen it will affect the smaller and larger scale.

CONCLUSION

DGGE profiles showed differences in the presence and absence and in the intensity of the bands. The main trend that was observed in this study was a link between HNA and dead cells, and LNA and live cells. These relationship suggests that the live and LNA cells function as the reservoir of the community and the HNA generate dead cells through viral infection and protozoan grazing. To further support these observations, cell sorting should be improved by trying to increase the enrichment factors and purity of the sorted fractions. Cell sorting can be improved by trying other apparatus, other techniques (droplet sorting) and other stains. Furthermore, to assess the distribution of species in the sorted fraction, sequencing could be carried out to discriminate between the bands seen on a DGGE profile.

CONCLUSION

Les deux objectifs de ce projet ont été atteints. Premièrement, la mise au point du triage cellulaire et deuxièmement, la distribution de la composition bactérienne selon leur état métabolique. En premier lieu, le triage cellulaire fonctionne avec le triage par commutation, mais dépendant des populations à trier, le facteur d'enrichissement variait entre 2 et 13. Chaque élément du triage (colorant, appareil, mode, population, etc.) doit être choisi avec précaution car ceux-ci peuvent faire varier grandement le facteur d'enrichissement. Pour chaque étude en écologie microbienne, tous les éléments de triage devraient être optimisés pour avoir le maximum d'enrichissement possible.

Les principaux résultats montrent des différences dans la composition entre les différentes fractions physiologiques d'un lac donné. Ces résultats suggèrent qu'une connexion peut exister entre l'état physiologique des bactéries et la composition phylogénétique du bactérioplancton ce qui aurait des implications dans le fonctionnement et la régulation des communautés. Ces résultats suggèrent aussi qu'il peut y avoir une sélection au niveau de l'activation, de l'inactivation et de la mortalité dans les communautés microbiennes naturelles, ce qui permet aux différentes espèces de survivre dans leur milieu.

Ces résultats montrent de minimes différences parce que les techniques (DGGE et triage cellulaire par commutation) sont utilisées à leur limite. Cette question devrait être analysée avec un cytomètre plus efficace et complétée avec le séquençage des bandes du profil de DGGE, mais un seul type de cytomètre était disponible pour cette étude et le séquençage des bandes a été essayé, mais sans succès à cause du manque d'expérience au niveau de la biologie moléculaire et du manque de ressources pour effectuer le séquençage.

ANNEXE I

BRAN-DE-SCIE:

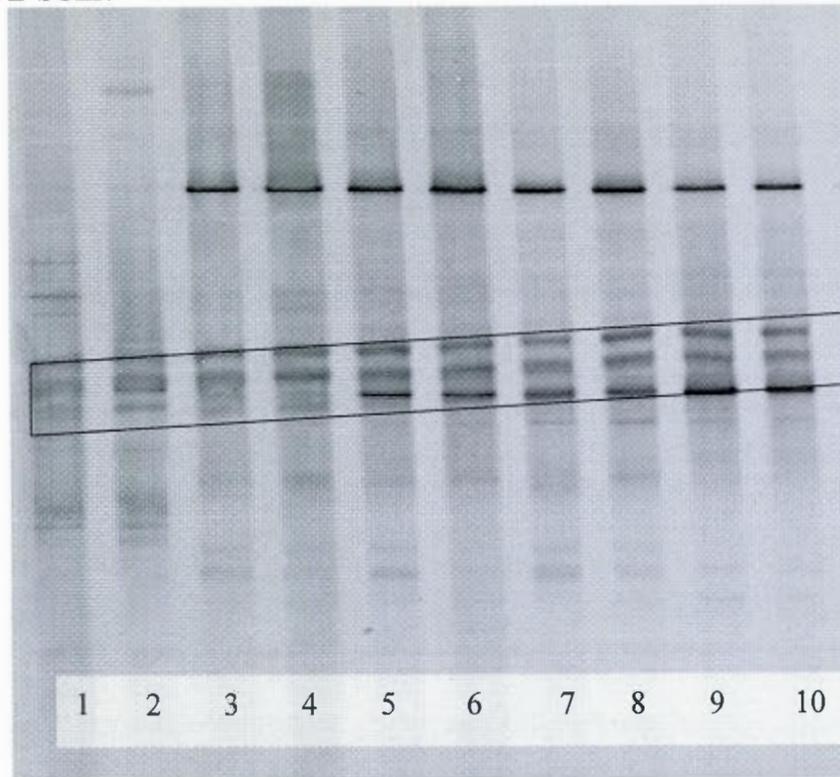


Fig a.1 Lake Bran-de-Scie and its sorted fractions (1. AE 2. 0.2 μ m, 3. Collect live, 4. Waste dead, 5. Collect dead, 6. Waste live, 7. Collect HNA, 8. Waste LNA, 9. Collect LNA, 10. Waste HNA). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

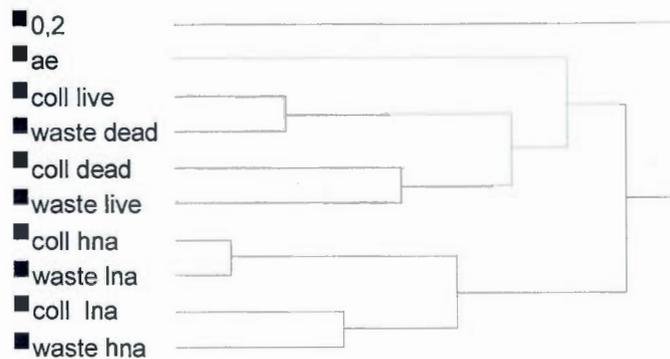


Fig. a.2 Cluster analysis of the lake Bran-de-Scie and its sorted fractions

BROME:

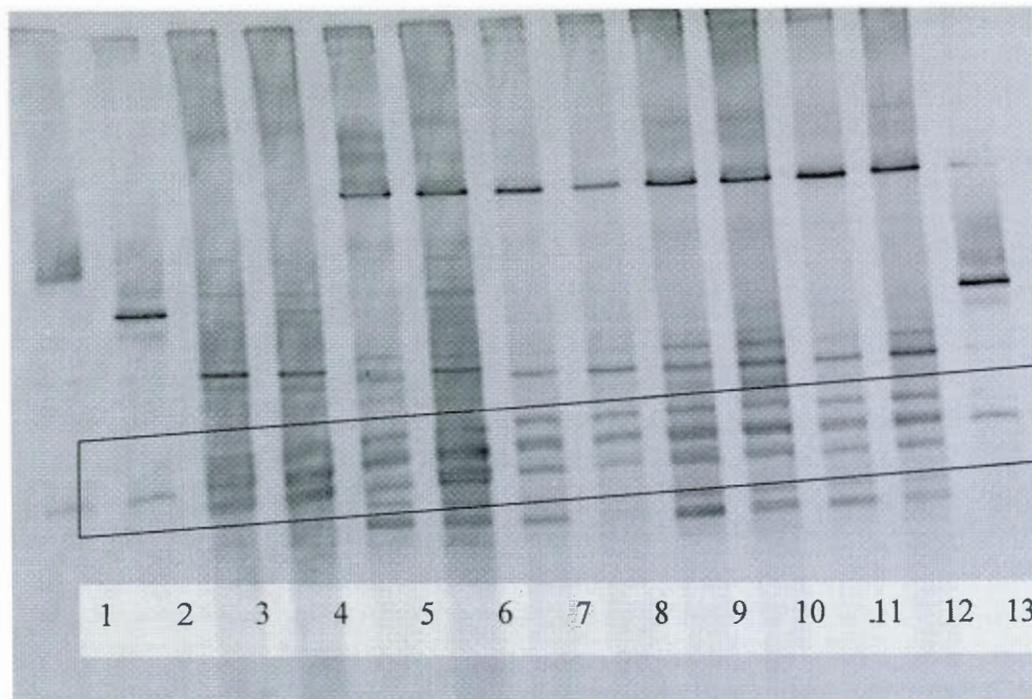


Fig a.3 Lake Brome and its sorted fractions (1. *S. epidermidis* – positive control 2. Beta – positive control, 3. Bulk, 4. AE, 5. Collect live, 6. Waste dead, 7. Collect dead, 8. Waste live, 9. Collect HNA, 10. Waste LNA, 11. Collect LNA, 12. Waste HNA, 13. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

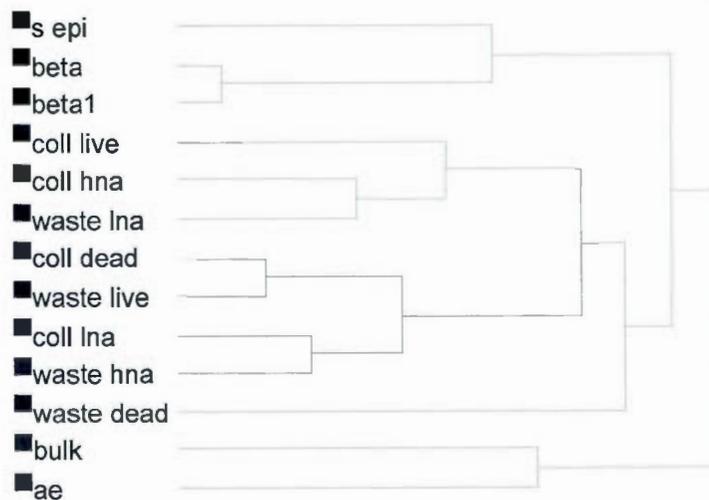


Fig. a.4 Cluster analysis of the lake Brome and its sorted fractions

SIMONEAU:

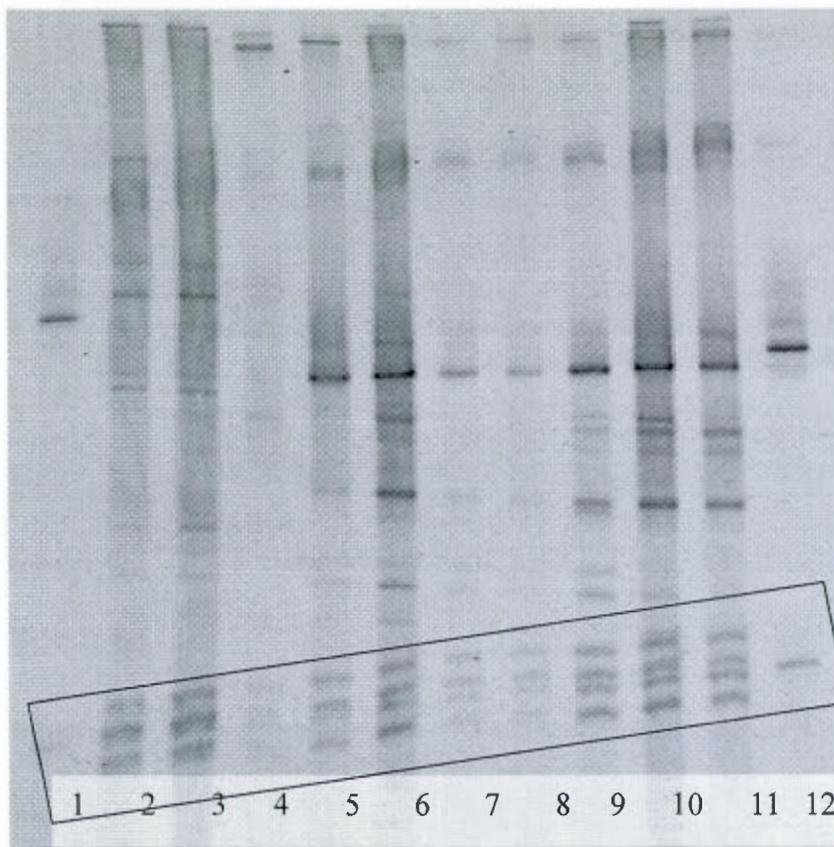


Fig a.5 Lake Simoneau and its sorted fractions (1.Beta – positive control, 2. Bulk, 3.AE 4. bubble, 5. Collect live, 6. Waste dead, 7. Collect dead, 8.Waste live, 9.. Collect HNA, 10. Waste LNA, 11.Waste HNA, 12. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.



Fig. a.6 Cluster analysis of the lake Simoneau and its sorted fractions

IN FRASER:

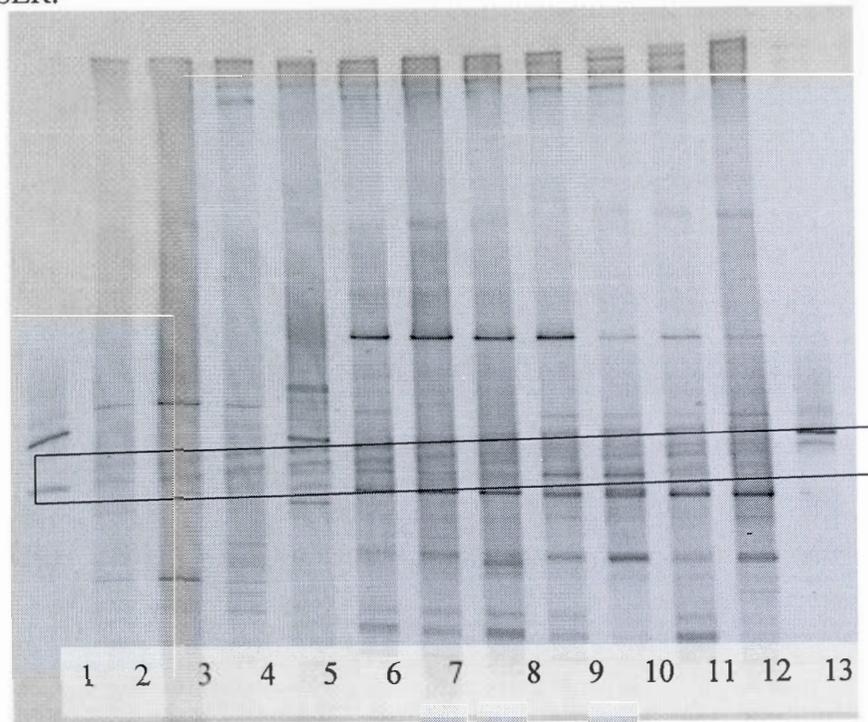


Fig a.7 In Fraser and its sorted fractions (1.Beta- positive control, 2.Bulk, 3.AE, 4.0.2, 5.bubble, 6.collect live, 7.waste dead, 8.collect dead, 9.waste live, 10.waste LNA, 11. collect LNA, 12. waste HNA, 13. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

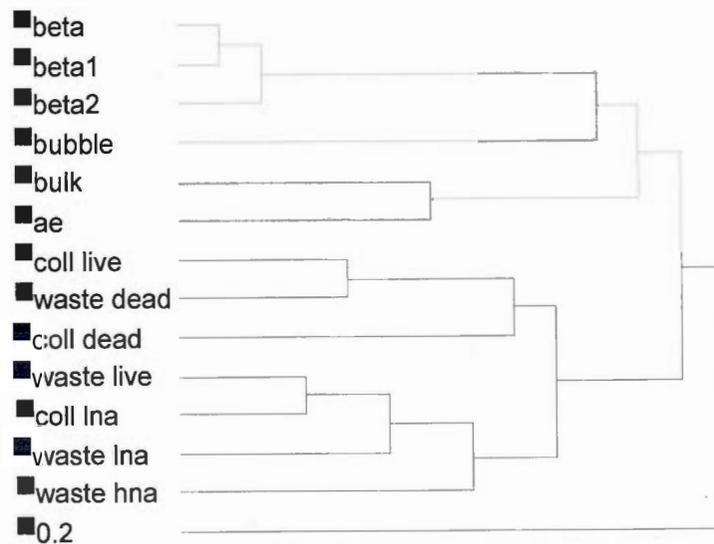


Fig. a.8 Cluster analysis of the In Fraser and its sorted fractions

IN BRAN-DE-SCIE:

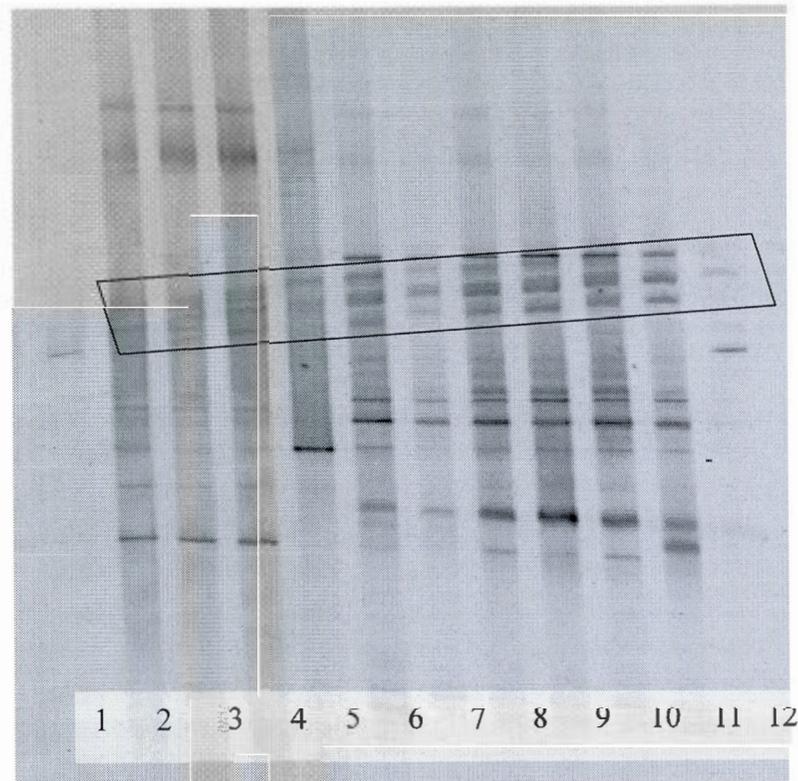


Fig a.9 In Bran-de-Scie and its sorted fractions (1.Beta – positive control, 2.bulk 0.5 primer, 3.bulk 1 primer, 4.ae, 5.bubble, 6.collect live, 7.collect dead, 8.waste live, 9.waste LNA, 10.collect LNA, 11.waste HNA, 12.Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

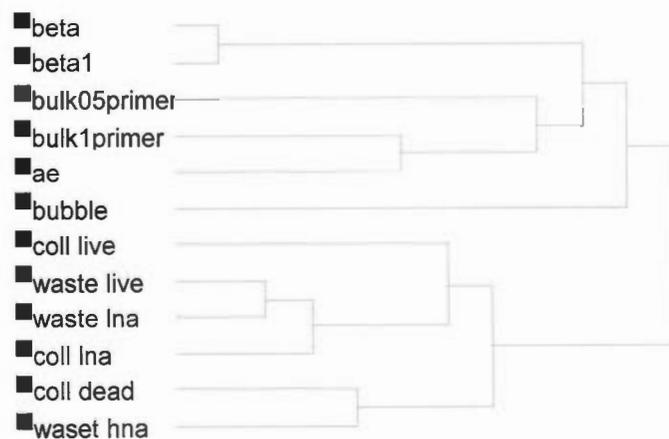


Fig. a.10 Cluster analysis of the in Bran-de-Scie and its sorted fractions

FRASER:

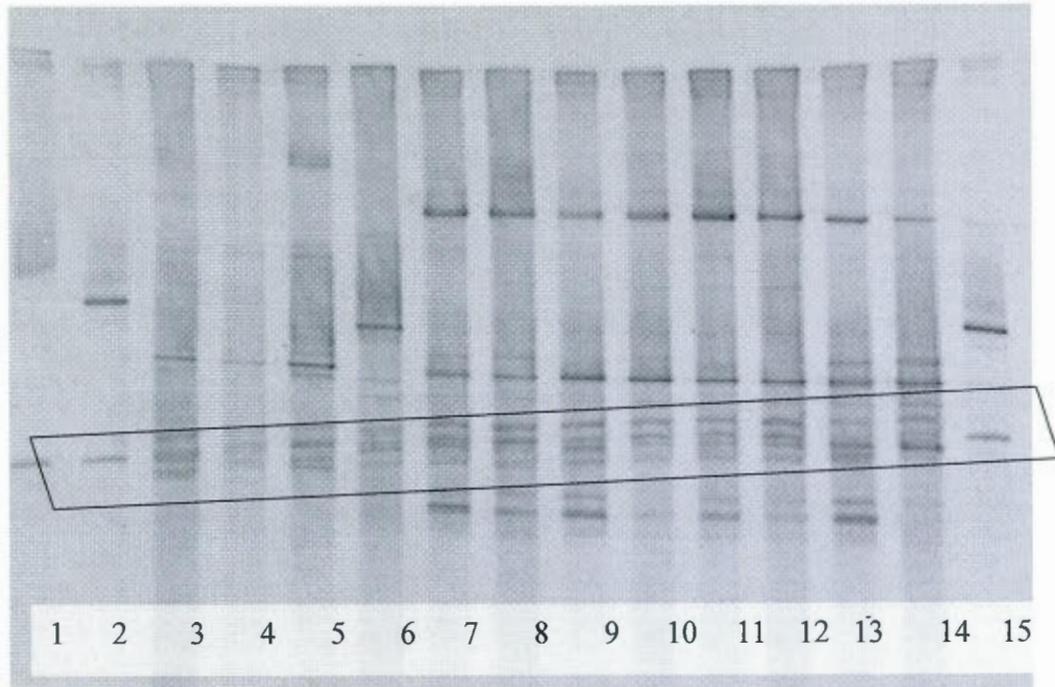


Fig a.11 Lake Fraser and its sorted fractions (1. *S. epidermidis*- positive control, 2. Beta – positive control, 3.bulk, 4.ae, 5.0,2, 6.bubble, 7.collect live, 8.waste dead, 9.collect dead, 10.waste live, 11.collect HNA, 12.waste LNA, 13.collect LNA, 14.waste HNA, 15.Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

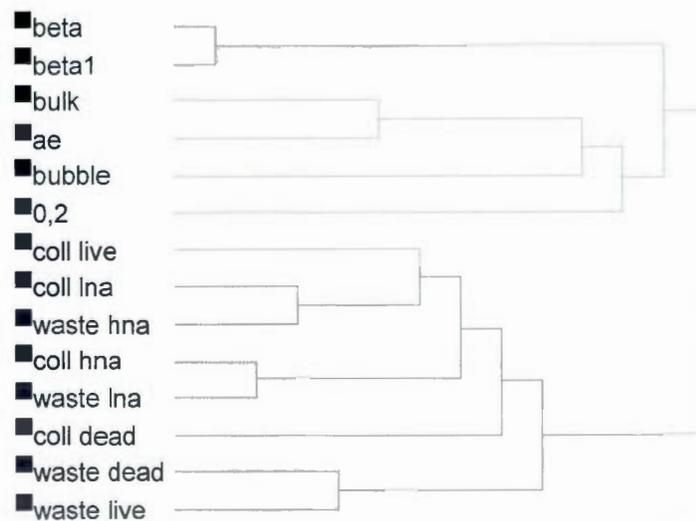


Fig. a.12 Cluster analysis of the lake Fraser and its sorted fractions

DES MONTS:

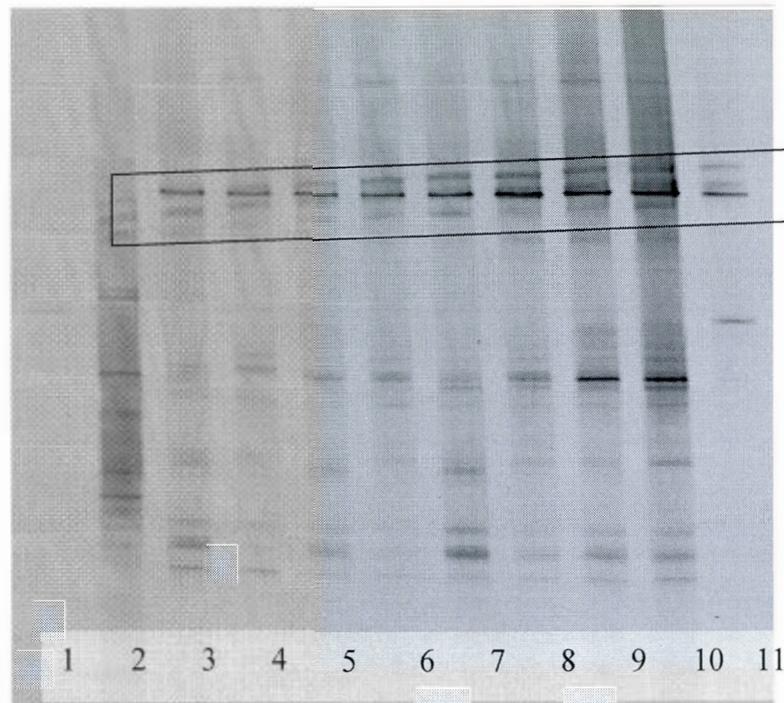


Fig a.13 Lake Des Monts and its sorted fractions (1.Beta – positive control, 2.bulk, 3.collect live, 4.waste dead, 5.collect dead, 6.waste live, 7.collect HNA, 8.waste LNA, 9.collect LNA, 10.waste HNA, 11.Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

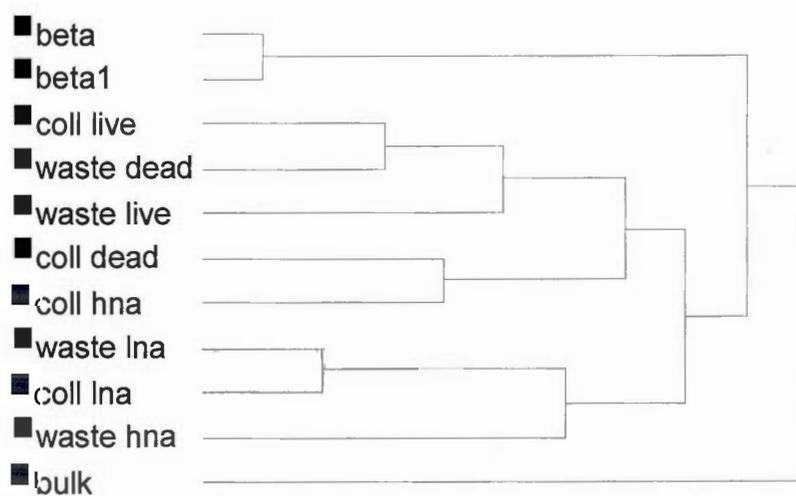


Fig. a.14 Cluster analysis of the lake Des Monts and its sorted fractions

STUKELY:

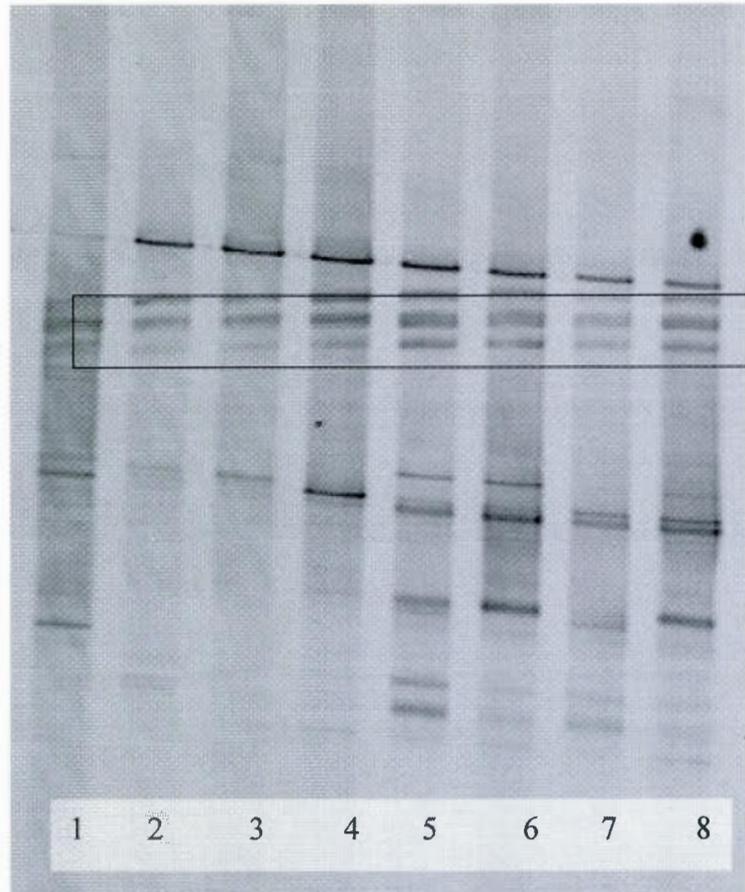


Fig a.15 Lake Stukely and its sorted fractions (1.ae, 2. collect live, 3.waste dead, 4.waste live, 5. collect HNA, 6.waste LNA, 7.collect LNA, 8.waste HNA). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

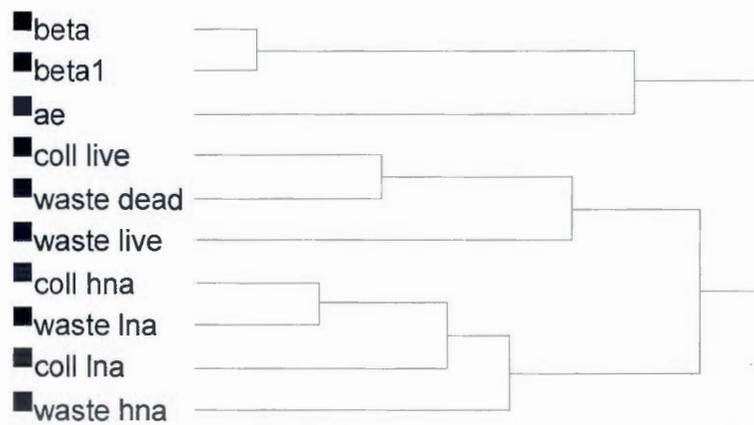


Fig. a.16 Cluster analysis of the lake Bowker and its sorted fractions

COLLECT DEAD:

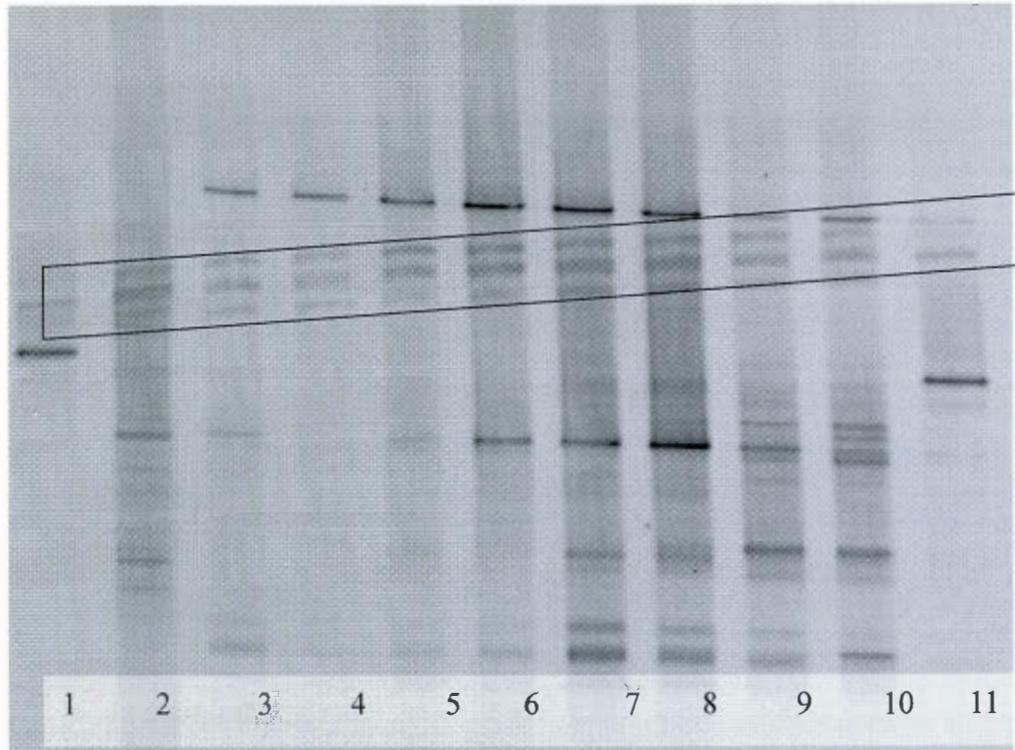


Fig. a.17 Comparison between the different fraction collect dead from the different sample lakes (1. Beta – positive control, 2. Mix, 3. Brome, 4. Simoneau, 5. Des Monts, 6. Bran-de-Scie, 7. Fraser, 8. Inlet Fraser, 9. Bowker, 10. Inlet Bran-de-Scie, 11. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

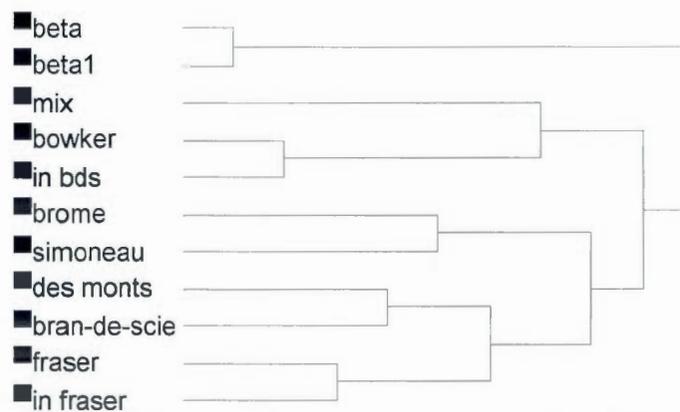


Fig. a.18 Cluster analysis of all the fractions from the collect dead from all the lakes

COLLECT HNA:

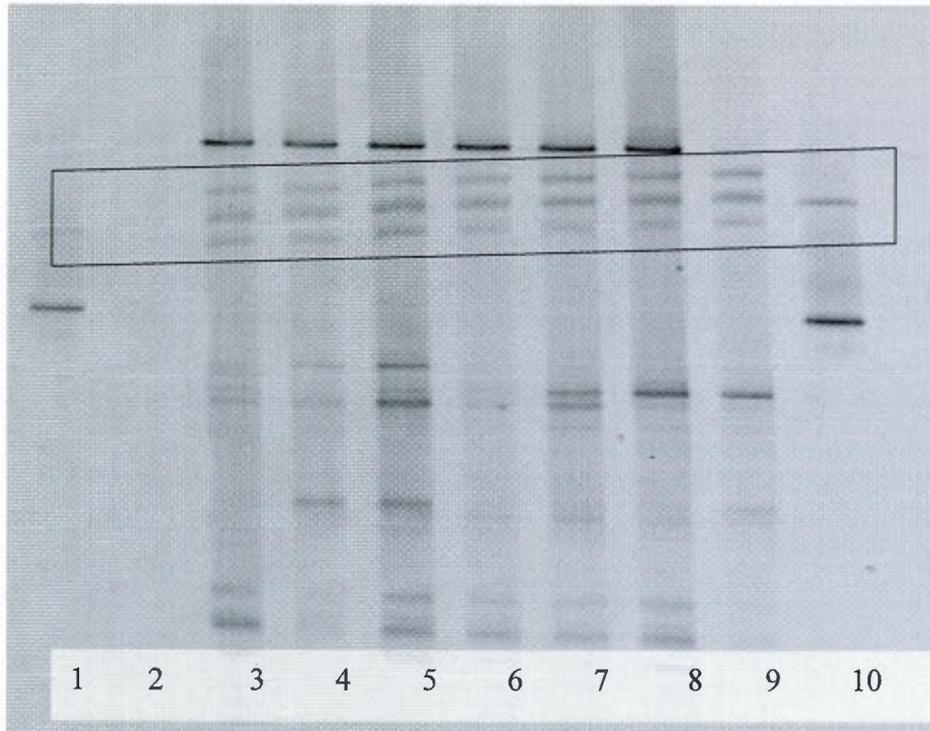


Fig. a.19 Comparison between the different fraction collect HNA from the different sample lakes (1. Beta – positive control, 2. Mix, 3. Brome, 4. Simoneau, 5. Stukely, 6. Des Monts, 7. Bran-de-Scie, 8. Fraser, 9. Bowker, 10. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.

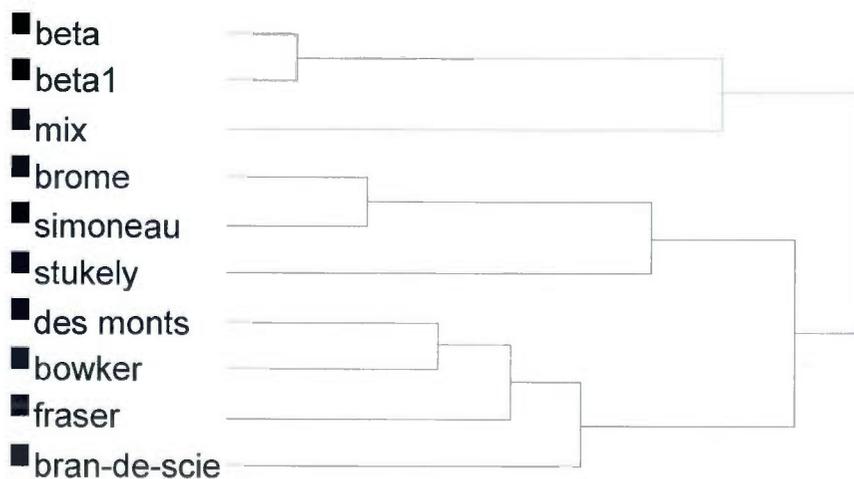


Fig. a.20 Cluster analysis of all the fractions from the collect HNA from all the lakes

COLLECT LNA:

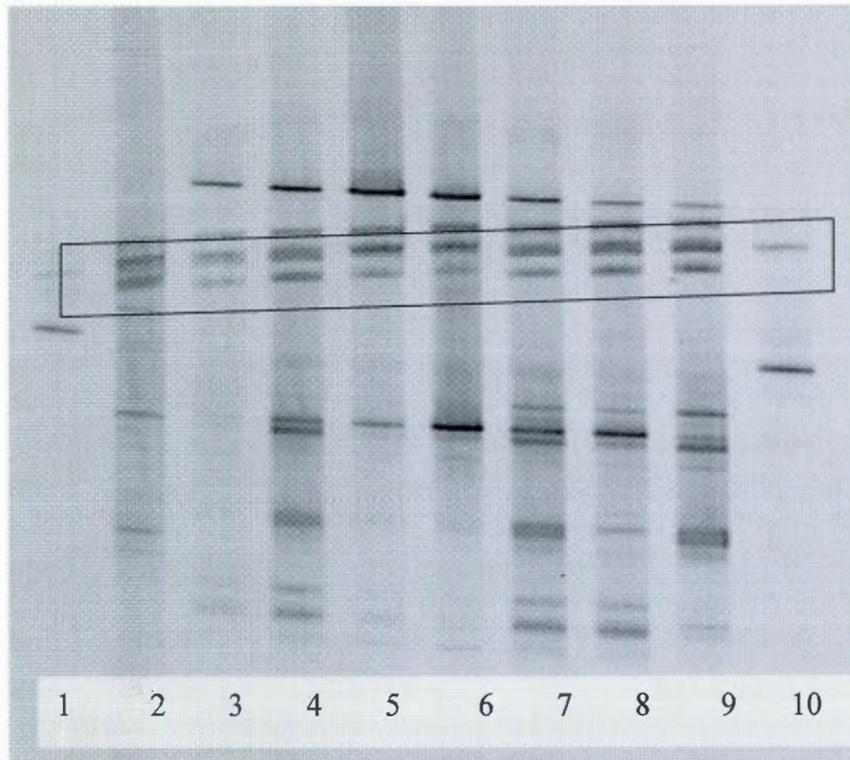


Fig. a.21 Comparison between the different fraction collect LNA from the different sample lakes (1. Beta – positive control, 2. Mix, 3. Brome, 4. Stukely, 5. Des Monts, 6. Bran-de-Scie, 7. Fraser, 8. Inlet Fraser, 9. Inlet Bran-de-Scie, 10. Beta – positive control). The bands between the lines are phantom bands and its close region.



Fig. a.22 Cluster analysis of all the fractions from the collect LNA from all the lakes

RÉFÉRENCES :

- ANONYMOUS. 2003. Product information Syto green, fluorescent nucleic acid stains. Molecular Probes. 5pp
- ANONYMOUS. 2004. What is flow cytometry?. Washington University School of Medicine. Department of Pathology and Immunology
- ANONYMOUS. 2004. Dneasy tissue handbook. Qiagen. 43pp.
- ANONYMOUS. 2004. Product information LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit. Molecular Probes. 4pp.
- ACINAS SG. *et al.* 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:514-522
- ADDY K. et GREEN L. 1997. Dissolved oxygen and temperature. Natural Ressources Facts. Fact Sheet no. 96-3
- ALONSO MC. *et al.* 2001. Distribution of virus-like particles in an oligotrophic marine environment (Alboran Sea, Western Mediterranean). *Microbial Ecology*. 42:407-415
- BENLLOCH S. *et al.* 1995. Bacterial diveristy in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*. 18:267-279

- BERNARD L. *et al.* 2000. Genetic diversity of total, active and cultivable marine bacteria in coastal seawater. *Aquatic Microbial Ecology*. 23:1-11
- BERNARD L. *et al.* 2000. Relationships among bacterial cell size, productivity and genetic diversity in aquatic environments using cell sorting and flow cytometry. *Microbial Ecology*. 40:148-158
- BERNARD L. *et al.* 2001. A new approach to determine the genetic diversity of viable and active bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*. 43:314-321
- BIANCHI A. *et al.* 2003. Microbial activities at the benthic boundary layer in the Aegean Sea. *Progress in Oceanography*. 57:219-236
- BINDER B. 1999. Reconsidering the relationship between virally induced bacterial mortality and frequency of infected cells. *Aquatic Microbial Ecology*. 18: 207-215
- BOSTRÖM KH. *et al.* 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnology and Oceanography: Methods*. 2: 365-373
- BOULOS L. *et al.* 1999. LIVE/DEAD® *Baclight*[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 37: 77-86

- CASTLE D. et KIRCHMAN DL. 2004. Composition of estuarine bacterial communities assessed by denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Limnology and Oceanography: Methods*. 2: 303-314
- CHEN PS. et LI CS. 2005. Real-time quantitative PCR with gene probe, fluorochrome and flow cytometry for microorganism analysis. *Journal of Environmental Monitoring*. 7: 257- 262
- COLE JJ. *et al.* 1993. Bacterial biomass and cell size distributions in lakes: more and larger cells in anoxic waters. *Limnology and Oceanography*. 38: 1627-1632
- DECAMP O. et RAJENDRAN N. 1998. Bacterial loss and degradation of bacterial membrane in preserved seawater samples. *Marine Pollution Bulletin*. 36 :856-859
- DECAMP O. et RAJENDRAN N. 1998. Assessment of bacterioplankton viability by membrane integrity. *Marine Pollution Bulletin*. 36 :739-741
- DEL GIORGIO PA. *et al.* 1996. Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green acid stain Syto 13. *Limnology and Oceanography*. 41: 783-789
- DUMESTRE J-F. *et al.* 2002. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquatic Microbial Ecology*. 26:209-221

- EILER A. *et al.* 2003. Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3701-3709
- FELIP M., PACE ML. et COLE JJ. 1996. Regulation of planktonic bacterial growth rates: the effects of temperature and resources. *Microbial Ecology*. 31:15-28
- FUCHS BM. *et al.* 2000. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environmental Microbiology*. 2:191-201
- GASOL JM. *et al.* 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 FO. *et al.* 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3721-3726
- GONZALEZ N., ANADON R. et VIESCA L. 2003. Carbon flux through the microbial community in a temperate sea during summer: role of bacterial metabolism. *Aquatic Microbial Ecology*. 33: 117-126
- HAGSTRÖM A. *et al.* 2002. Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3628-3633
- HAHN MW. et HÖFLE MG. 2001. Grazing of protozoa and its effects on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 35:113-121

- HENNES KP. et SIMON M. 1995. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:333-340
- HOBBIE JE. *et al.* 1977. Use of nucleopore filter for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 1225-1228
- HOEFEL D. *et al.* 2003 Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry : a comparison of culture-based technique. *Journal of Microbiological Methods*. 55:585-597
- HORNER-DEVINE MC. *et al.* 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*. 6: 613-622
- ISHII K. et FUKUI M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multi-template PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:3753-3755
- JASPERS E. *et al.* 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 153-164
- KEMP PF. et ALLER JY. 2004. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*. 47:161-177

- KINSAND V. et WIKER J. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods*. 54: 183-191
- LEBARON P. *et al.* 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* . 64:1725-1730
- LEBARON P. *et al.* 2001. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic system? *Applied and Environmental Microbiology*. 76:1775-1782
- LEBARON P. *et al.* 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*. 28:131-140
- LEE S. et KEMP P.K. 1994. Single-cell RNA content of natural marine planktonic bacteria measured by hybridization with multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes. *Limnology and Oceanography*. 39:869-879
- LINDSTRÖM ES. 1998. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiology Ecology*. 27:163-174.
- LINDSTRÖM ES. 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microbial Ecology*. 40: 104-113
- LINDSTRÖM ES. 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition : results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microbial Ecology*. 42: 598-605

- LINDSTRÖM ES. et BERGSTRÖM A. 2004. Influence of inlet bacteria on bacterioplankton assemblage composition in lakes of different hydraulic retention time. *Limnology and Oceanography*. 49: 125-136
- LINDSTRÖM ES. et LESKINEN E. 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
- MACGREGOR BJ. 1999. Molecular approaches to the study of aquatic microbial communities. 10: 220-224
- MARANGER R *et al.* 2002. Accumulation of damaged bacteria and viruses in lake water exposed to solar radiation. *Aquatic Microbial Ecology*. 28:213-227
- MASSANA R. et JÜRGENS K. 2003. Composition and population dynamics of planktonic bacteria and bacterivorous flagellates in seawater chemostat cultures. *Aquatic Microbial Ecology*. 32:11-22
- McARTHUR JV. *et al.* 1992. Genetic diversity of bacteria along a stream continuum. *Journal of North America Benthological Society*. 11:269-277
- McCAIG AE. *et al.* 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:1721-1730
- METHE BA. et ZEHR JP. 1999. Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes : do species assemblages reflect lake water chemistry. *Hydrobiologia*. 401: 77-96

- MURRAY AE. *et al.* 1996. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:2676-2680
- MURREL JC. *et al.* 1998. Molecular methods for the study of methanotroph ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 27:103-114
- MUYLAERT K. *et al.* 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:4740-4750
- MUYZER G. *et al.* 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 695-700
- MUYZER G. *et al.* 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiology*. 164 : 165-172
- MUYZER G. et SMALLA K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127-141
- MUYZER G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*. 2: 317-322

- NEBE-VON CARON G. *et al.* 1998. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology*. 84:988-998
- NEBE-VON CARON G. *et al.* 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*. 42: 97-114
- NOBLE RT. *et* FURHMAN JA. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*. 14:113-118
- PEDUZZI P. *et* SCHIEMER F. 2004. Bacteria and viruses in the water column of tropical freshwater reservoirs. *Environmental Microbiology*. 6:707-715
- PERNTHALER J. *et al.* 1997. Contrasting bacterial strategies to coexist with flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:596-601
- POLYMENAKOU PN. *et al.* 2005. Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*. 49:367-378
- POSCH T. *et al.* 1997. Cell-specific respiratory activity of aquatic bacteria studied with the tetrazolium reduction method , cyto-clear slides, and image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 867-873

- RESINA-PELFORT O. *et al.* 2001. Effects of deflected droplet electrostatic cell sorting on the viability and exoproteolytic activity of bacterial cultures and marine bacterioplankton. *Systematic and applied microbiology*. 24:31-36
- RICKLEFS RE. et MILLER GL. 2005. *Écologie*. Ed. De Boeck. Bruxelles. 821 pp.
- RODRIGUEZ-VALERA F. 2004. Environmental genomics, the big picture?. *FEMS Microbiology Letters*. 231: 153-158
- SCHLOTTER M. *et al.* 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:647-660
- SCHNEEGURT MA. et KULPA CF. 1998. The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 27:73-39
- SCHWARTZ A. 1998. Standardizing flow cytometry : A classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry*. 33:106-114
- SCULLY NM. *et al.* 2003. Photochemical effects on microbial activity in natural waters: the interaction of reactive oxygen species and dissolved organic matter. *FEMS Microbiology Ecology*. 46:353-357
- SERVAIS P. *et al.* 1999. Coupling bacterial activity measurements with cell sorting by flow cytometry. *Microbial Ecology*. 38:180-189
- SERVAIS P. *et al.* 2001. Are the actively respiring cells (CTC+) those responsible for bacterial production in aquatic environments? *FEMS Microbiology Ecology*. 35:171-179

- SERVAIS P. *et al.* 2003. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquatic Microbial Ecology*. 33:41-51
- SHERR BF. *et al.* 1999. Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology*. 18:117-131
- SIMEK K. *et al.* 1997. Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:587-595
- SIMEK K. *et al.* 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellated grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2723-2733
- SIMEK K. *et al.* 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2723-2733
- SMITH E. 1998. Coherence of microbial respiration rate and cell-specific bacterial activity in a coastal planktonic community. *Aquatic Microbial Ecology*. 16:27-35
- SMITH E. et DEL GIORGIO P. 2003. Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? *Aquatic Microbial Ecology*. 31:203-208

- SOMMARUGA R. et PSENNER R. 1995. Permanent presence of grazing-resistance bacteria in a hypertrophic lakes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:3457-3459
- STEFFAN RJ. et ATLAS RM. 1991. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annual Review of Microbiology*. 45: 137-161
- TADONLÉKÉ RD. *et al.* 2005. Microbial food webs in boreal humic lakes and reservoirs: ciliates as a major factor related to the dynamic of the most active bacteria. *Microbial Ecology*. 49:325-341
- TRUSOVA M. YU. Et GLADYSHEV MI. 2002. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic Siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Microbial Ecology*. 44:252-259
- VADSTEIN O. *et al.* 2003. Is phosphorus limitation of planktonic heterotrophic bacteria and accumulation of degradable DOC a normal phenomenon in phosphorus-limited system? A microcosm study. *FEMS Microbiology Ecology*. 46:307-316
- VIVES-REGO J. *et al.* 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:429-448
- WALLNER G. *et al.* 1997. Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4223-4231
- WEINBAUER MG. et HÖFLE MG. 1998. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 431-438

- WETZ MS. et WHEELER PA. 2004. Response of bacteria to stimulated upwelling phytoplankton blooms. *Marine Ecology Progress Series*. 272:49-57
- WOESE CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51:221-271
- YANNARELL AC. *et al.* 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology*. 46:391-405
- ZEHR JP. et VOYTEK MA. 1999. Molecular ecology of aquatic communities: reflections and future directions. *Hydrobiologia*. 401: 1-8
- ZUBKOV MV. *et al.* 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5210-5218