

Caractérisation des particules virales planctoniques dans un lac du Massif Central français : aspects méthodologiques et premiers résultats

T. Sime-Ngando^{1*}
J.-P. Mignot¹
C. Amblard¹
G. Bourdier¹
C. Desvillettes¹
C. Quiblier-Lloberas¹

Mots clés : Lacs, plancton, virus, phage, méthodes.

Dans cette note, nous décrivons une méthode simple, permettant l'ultracentrifugation de particules virales planctoniques et leur observation en microscopie électronique à transmission. Une description de différents morphotypes de particules assimilables à des virus est faite à partir d'échantillons prélevés dans la couche euphotique d'un lac eutrophe (Aydats), au cours des périodes printanière et estivale. Ces particules présentent chacune une capsidie icosaédrique régulière à 6 faces et une queue, dont les dimensions sont similaires à celles des phages décrits en milieu marin. La diversité des formes et le nombre de virions (10 fois supérieur à celui des bactéries), permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle les virus interviennent de façon significative dans le contrôle des abondances des communautés bactériennes en milieu lacustre.

Characterization of planktonic virus-like particles in a French mountain lake : methodological aspects and preliminary results

Keywords : Lakes, plankton, virus, phage, methods.

In this short communication, we describe a simple method to ultracentrifuge and concentrate planktonic virus-like particles, for their examination with a transmission electron microscope. A description of different morphotypes of particles clearly assimilable to viruses is made in plankton samples from the euphotic layer of a eutrophic lake (Lake Aydat), during its spring and summer development. The particles possess a tail and a 6-sided icosahedral capsid-head, with dimensions similar to those of phages already described in marine systems. The diversity of viral forms and their abundance (10 fold higher than that of bacteria) in Lake Aydat, suggests a significant role in controlling bacterial number in lakes.

1. Introduction

Des travaux récents, menés en milieu marin, ont mis en évidence l'importance quantitative de particules assimilables à des virus, dans la communauté microbienne planctonique (Børsheim 1993, Fuhrman & Suttle 1993, Suttle 1994). La forte densité de telles particules dans le plancton (10^4 à 10^9 ml⁻¹) stimule les efforts des planctonologues, en vue de comprendre le rôle des virus dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques (Murray & Eldridge 1994), no-

tamment, dans les processus de perte affectant les communautés bactériennes (Fuhrman & Noble 1995, Weinbauer & Peduzzi 1995), phytoplanctoniques (Suttle et al. 1990) et de protozoaires (Garza & Suttle 1995), dans la nutrition des protistes (Gonzalez & Suttle 1993), dans le maintien de la diversité des peuplements microbiens, dans la génération des vecteurs de recombinaison génétique, dans l'induction d'aggrégats planctoniques et dans le recyclage des nutriments et de l'énergie (Fuhrman & Suttle 1993). Cependant, peu de travaux concernent les virions planctoniques d'eau douce (Hennes & Simon 1995). Par ailleurs, les auteurs ayant utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) pour l'observation des virus planctoniques ne donnent pas de détails méthodologiques sur la réalisation des supports permettant de

1. Laboratoire de Biologie Comparée des Protistes, URA CNRS 1944, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France.

* Auteur auquel la correspondance sera adressée.

concentrer les virus planctoniques par ultracentrifugation, directement sur des grilles porte objet pour MET.

La note présentée ici concerne la description d'une méthode simple, permettant l'ultracentrifugation de particules virales planctoniques sur des grilles porte objet pour observation en MET. L'utilisation de cette méthode a permis une première description des diverses formes virales rencontrées dans la couche euphotique d'un lac eutrophe et dimictique du Massif Central français (le lac d'Aydat).

2. Matériels et méthodes

La technique utilisée correspond à une modification de celle décrite par Bratbak et Haldal (1993) et par Suttle (1993). Elle consiste à fabriquer d'abord un support adaptable au fond d'un tube à centrifuger, sur lequel sont fixées des grilles porte objet pour MET, destinées à recueillir les virions lors de l'ultracentrifugation. Hauts d'environ 12 mm, pesant approximativement $1,40 \pm 0,10$ g ($n = 50$) et munis d'une plate-forme de 12 mm de diamètre où peuvent être fixées jusqu'à trois grilles, nos supports sont réalisés par polymérisation d'un mélange commercial adéquat d'une résine polyester préaccélérée de type GTS et d'un durcisseur, le peroxyde d'éthylméthylcétone (Soloplast-Vosschemie, France). Le moule est constitué par des tubes à essais stériles de type polystyrène cristal (CLV Fressinet, France) et de dimensions similaires à celles des tubes utilisées pour l'ultracentrifugation des échantillons (Fig. 1A). La nature cristalline des tubes de moulage est importante. En fin de polymérisation, la pellicule des tubes autour de la résine vitrifiée et lisse devient cassante, ce qui permet en effet, un démoulage aisé. Après démoulage, la plate-forme des supports est réalisée par ponçage dans l'eau, à l'aide d'une série de feuillets de papiers abrasifs imperméables, de finesse de grains croissante.

La plate-forme de chaque support est recouverte par un disque de 10 mm de diamètre, découpé dans du «scotch double face» et percé de 3 trous de 2 mm de diamètre chacun (Fig. 1B). Des grilles de 400 mesh à face repérable (Pelanne Instruments, France) et préalablement recouvertes d'une membrane de Pioloforme F selon la méthode décrite par Stockem (1970), sont collées sur les disques de «scotch double face», au dessus de chaque trou, de manière à ce que, seuls, les rebords des grilles soient légèrement prises par la colle du scotch (Fig. 1C). En raison d'une grande stabilité thermique, les films de Pioloforme ont l'avantage d'être plus résistantes au flux d'électrons du MET que les films Formvar, et ne nécessitent aucun renforcement par évaporation de carbone (Stockem 1970).

Les supports garnis de grilles sur leur plate-forme sont placés au fond de tubes à ultracentrifugation stérilisés de type polyallomère souple (Kontron Instruments, France), puis 5 à 10 ml d'échantillon sont ajoutés dans les tubes qui sont ensuite équilibrés pour l'ultracentrifugation (Fig. 1D). Les échantillons sont centrifugés à $120\,000 \times g$ (26 000 rpm pour le rotor utilisé) pendant 2 heures à 4°C , à l'aide d'une ultracentrifugeuse Kontron® de type T1180, munie du rotor «Swinging Bucket TST4114». Nous avons calculé, selon la formulation de Stokes présentée par Suttle (1993), que la vitesse et le temps de centrifugation considérés lors de notre étude sont suffisants, pour que des particules de 80-100 Sevedbergs contenues dans les volumes d'échantillon considéré, sédimentent avec un rendement de l'ordre de 100%.

Après la centrifugation, le surnageant est pipeté, les supports sont extraits des tubes de centrifugation et une grille est retirée de la plate-forme puis mise à sécher directement sur papier filtre dans une boîte de Pétri. Elle sert à contrôler les éventuelles pertes au cours des opérations ultérieures. Les deux autres grilles sont contrastées à l'aide d'une solution d'acétate d'uranyle à 2% pendant 30 secondes et lavées deux fois à l'eau distillée avant d'être mises à sécher (Fig. 1E). Les solutions d'acétate d'uranyle et d'eau distillée utilisées sont, au préalable, préfiltrées à l'aide d'une unité de filtration jetable de type Anotop 10 (Whatman), de 20 nm de porosité. Les observations microscopiques sont effectuées à l'aide d'un MET JEOL 1200 EX, à 80Kv et à des grossissements directs variant de $20\,000\times$ à $150\,000\times$.

Les échantillons tests utilisés pour caractériser les formes virales planctoniques lacustres ont été recueillis au cours d'une série de 8 campagnes de prélèvements effectuées entre le 23 Mai et le 24 Juillet 1995, dans la zone euphotique du lac eutrophe et dimictique d'Aydat. Ils ont été fixés par une solution de glutaraldéhyde (préfiltrée à l'aide de l'Anotop 10, voir ci-dessus) à une concentration finale de 2%, conservés à l'obscurité à une température de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, et traités par un surfactant (le tween 80, Sigma) juste avant analyse, afin de séparer les virus des agrégats présents.

3. Observations et discussion

Au moins quatre groupes de particules clairement assimilables aux virus ont pu être distingués dans la couche euphotique du lac d'Aydat (Fig. 2B,C,D,E). Il s'agit de particules présentant une capsidie icosaédrique régulière à 6 faces et une queue, caractéristiques des bactériophages (Bradley 1967, Frank & Moebus 1987, Francki et al. 1991). Cependant, les cyanophages (Suttle & Chan 1993) et certains virus d'or-

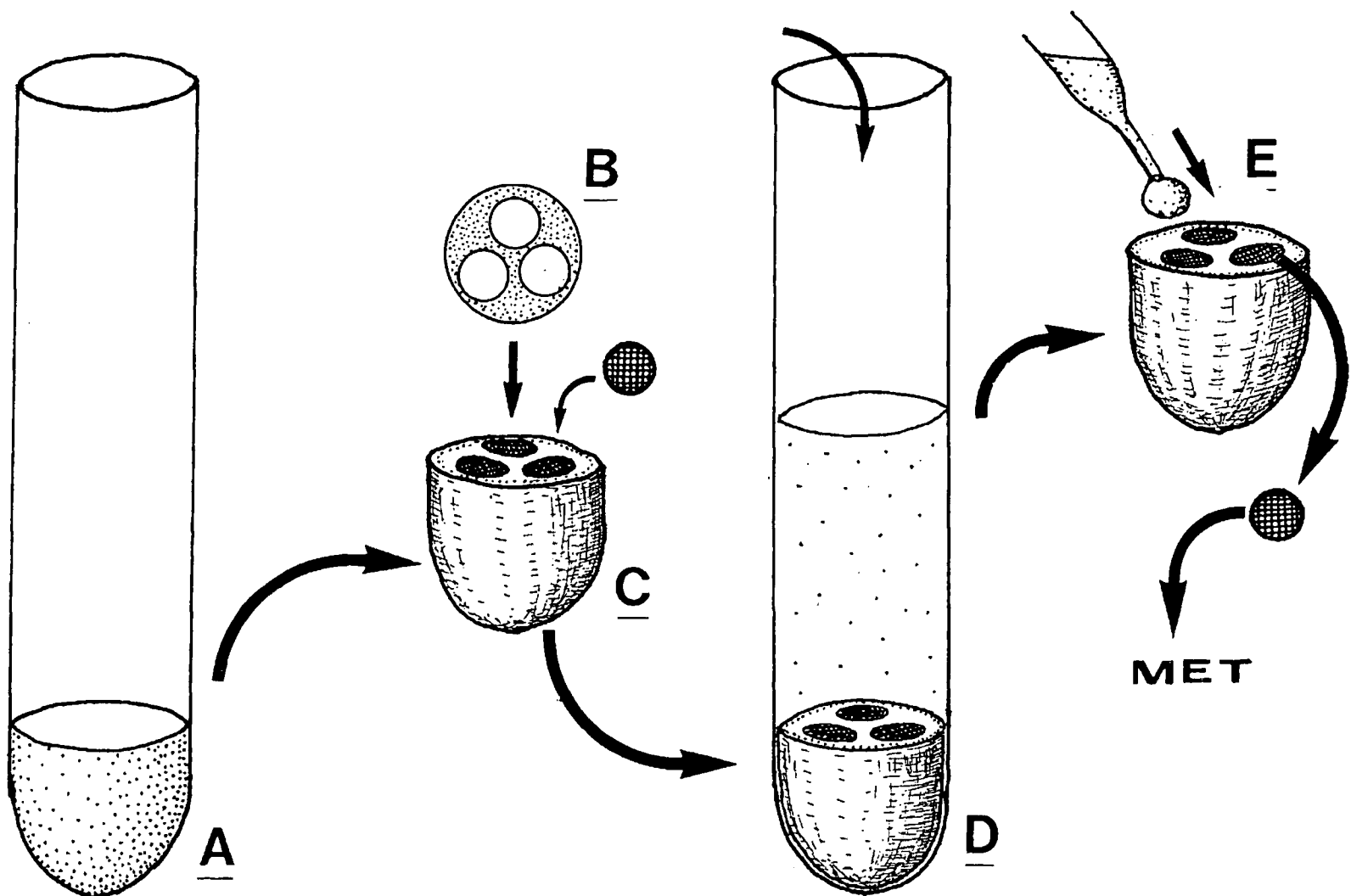


Fig. 1. Représentation schématique des principales étapes du protocole suivi pour collecter les virions planctoniques libres sur des grilles porte objet, en vue de leur observation au microscope électronique à transmission (MET) (pour explications complémentaires, voir le texte).

Fig. 1. Principal steps of the protocol to ultracentrifuge concentrate free planktonic virions directly on transmission electron microscope (MET) grids fixed on the platform of a resin-molded support.

ganismes eucaryotes (Van Etten et al. 1991) peuvent avoir une morphologie similaire à celle des virus qui ont pour hôtes des bactéries hétérotrophes. Les groupes observés dans le lac d'Aydat sont distincts par le diamètre de leur capsid supérieur à 70 nm mais inférieur ou égal à 100 nm, la longueur de leur queue pouvant être supérieure à 300 nm. Ces observations se rapprochent de celles faites en milieu marin où la communauté virale planctonique est essentiellement constituée de particules polyédriques, présentant une queue de longueur variant autour de 100 nm et une tête de type icosa- ou octaédrique, dont le diamètre est généralement inférieur à 100 nm (Børshheim 1993). Dans nos échantillons, nous n'avons pas observé la présence de particules virales géantes (diamètre de la capsid > 200 nm), telles que celles rapportées par Bratbak et al. (1992) dans des eaux marines côtières et

plus récemment, par Sommaruga et al. (1995) dans un réservoir eutrophe, le Réservoir Sau (Espagne).

En dehors de la présence d'une tête à symétrie régulière et d'une queue, il n'existe pas de critères objectifs permettant l'identification de virus sauvages libres à l'aide du MET, ce qui entraîne une évidente sous-estimation de la diversité et de l'abondance des virus aquatiques. L'importance numérique relative des formes virales et des bactéries dans le lac eutrophe d'Aydat, estimée à l'aide des observations microscopiques telle que celle de la Figure n° 2A, est, en moyenne, de 10 ± 4 ($n = 20$ échantillons prélevés aux différentes dates de prélèvements effectués au printemps et en été 1995) particules virales pour une cellule bactérienne présente. Cette importance relative entre les virus et les bactéries se rapproche de celle rapportée par de nombreux auteurs en milieu marin oligo-

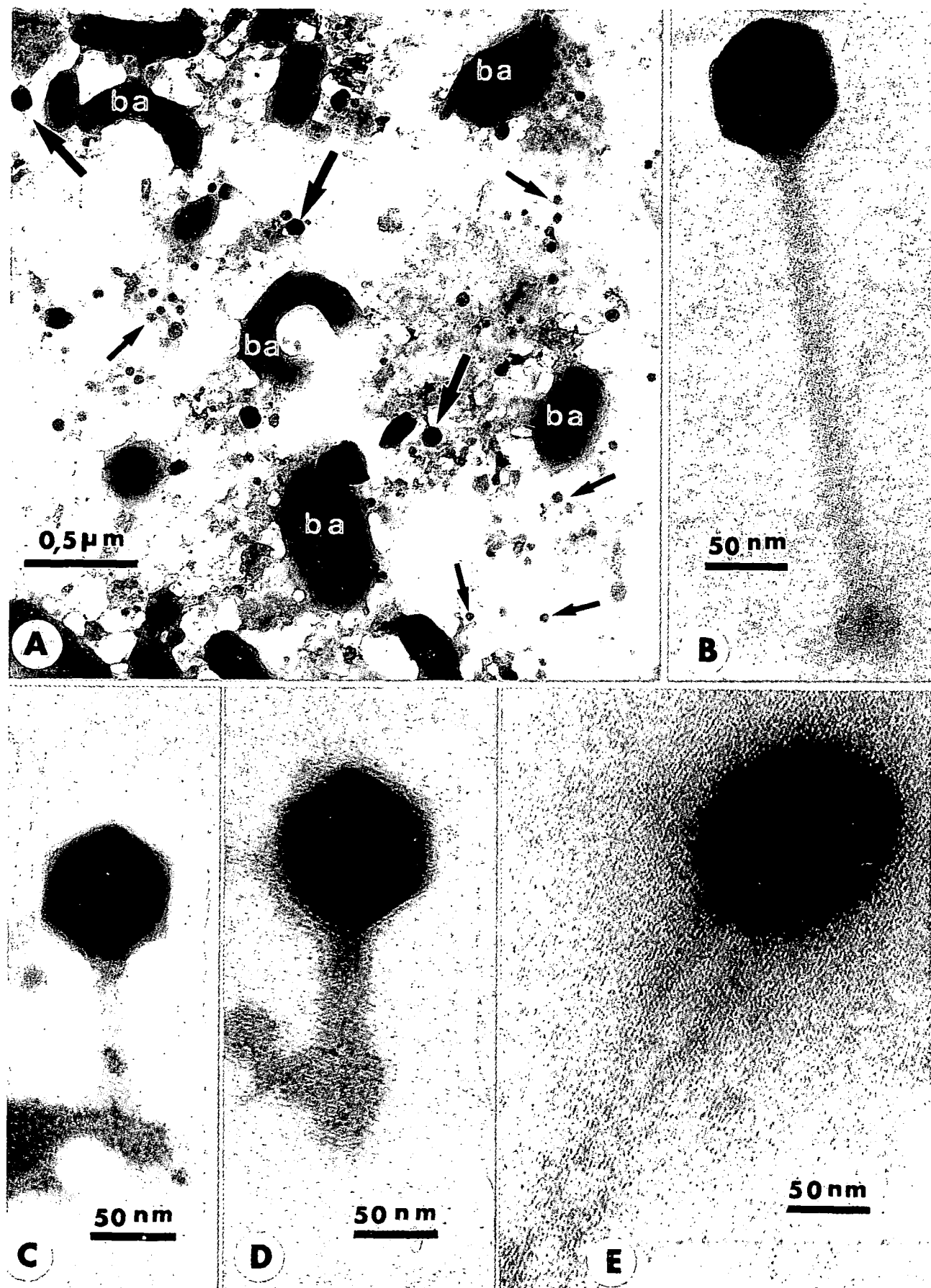


Fig. 2. Quelques exemples d'échantillons récoltés dans la couche euphotique du lac d'Aydat au cours de son développement printanier et estival (1995), illustrant l'importance quantitative (A) et différents morphotypes (B, C, D, E) de particules clairement assimilables aux virus. Sur la Figure A, prise à un faible grandissement et à partir d'un échantillon non contrasté, on reconnaît de nombreuses bactéries (ba) et divers types de particules virales dont certains sont repérés par des flèches de différentes tailles. Les échantillons B, C, D, et E ont été contrastés à l'acétate d'uranyle.

Fig. 2. Illustration of the quantitative importance (A) and different morphotypes (B, C, D, E) of free living aquatic virus-like particles from samples collected in the surface waters of the eutrophic Lake Aydat. A: Bacterial cells (ba) and viruses of different sizes (arrows) in a natural sample. B, C, D & E: Different morphotypes of contrasted (with uranyl acetate) virus-like particles.

trophe, où l'abondance des virus est généralement 5 à 10 fois plus élevée que celle des bactéries (Børsheim 1993, Fuhrman & Suttle 1993, Suttle 1994).

Bien qu'aucune affiliation taxonomique ne puisse être déduite à partir d'observations en MET, les différentes formes de particules virales observées dans nos échantillons reflètent, sans aucun doute, une diversité impliquant la diversité des hôtes spécifiques. Compte tenu de notre estimation de l'importance relative des particules virales et bactériennes dans le lac eutrophe d'Aydat (Fig. 2) et en supposant que la production virale lacustre est de type lytique, nous émettons l'hypothèse que la lyse virale intervient comme un facteur important dans la structure et le fonctionnement des réseaux trophiques lacustres, notamment dans les processus de pertes affectant les communautés bactériennes, comme cela a déjà été évoqué par Hennes & Simon (1995). Jusqu'à présent, il était généralement admis que les pertes des communautés bactériennes planctoniques étaient, pour une grande part, provoquées par la pression de prédation exercée par les protistes phagotrophes (Porter et al. 1979, Azam et al. 1983, Sherr & Sherr 1984). Par ailleurs, il semble que l'utilisation de la technique décrite ici puisse permettre, après les validations statistiques nécessaires, une estimation de la densité absolue, et non plus seulement relative, des particules virales pélagiques.

Remerciements :

Nous remercions B. Vignes pour l'ultracentrifugation des échantillons et J.-L. Vincenot pour le tirage des photographies.

Travaux cités

- Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A. & Thingstad F. 1983. — The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10 : 257-263.
- Børsheim K.Y. 1993. — Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102 : 141-159.
- Bradley D.E. 1967. — Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31 : 230-314.
- Bratbak G. & Heldal M. 1993. — Total count of viruses in aquatic environments. In : Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J., eds. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Boca Raton, Lewis Publishers, 135-138.
- Bratbak G., Haslund O.H., Heldal M., Naess A. & Røeggen T. 1992. — Giant marine viruses? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 85 : 201-202.
- Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L. & Brown F. 1991. — Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2 : 1-450.
- Frank H. & Moebus K. 1987. — An electron microscopic study of bacteriophages from marine waters. *Helgoländer Meeresunters* 41 : 385-414.
- Fuhrman J.A. & Noble R.T. 1995. — Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanogr.* 40 : 1236-1242.
- Fuhrman J.A., & Suttle C.A. 1993. — Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography* 6 : 51-63.
- Garza D.R. & Suttle C.A. 1995. — Large double-stranded DNA viruses which cause the lysis of a marine heterotrophic nanoflagellate (*Bodo* sp.) occur in natural marine viral communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 9 : 203-210.
- Gonzalez J.M. & Suttle C.A. 1993. — Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles : ingestion and digestion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 94 : 1-10.
- Hennes K.P. & Simon M. 1995. — Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 333-340.
- Murray A.G. & Eldridge P.M. 1994. — Marine viral ecology : incorporation of bacteriophage into the microbial planktonic food web paradigm. *J. Plankton Res.* 16 : 627-641.
- Porter K.G., Pace M.L. & Battey J.F. 1979. — Ciliated protozoa as links in freshwater planktonic food chains. *Nature* 277 : 563-565.
- Sherr B.F. & Sherr E.B. 1984. — Role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In : Klug M.J. & Reddy C.A., eds. *Current perspectives in microbial ecology*. Washington DC, American Society for Microbiology, 412-423.
- Sommaruga R., Krössbacher M., Salvenmoser W., Catalan J. & Psenner R. 1995. — Presence of large virus-like particles in a eutrophic reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.* 9 : 305-308.
- Stockem W. 1970. — Die eignung von pioloform F für die herstellung elektronenmikroskopischer trägerfilme. *Mikroskopie* 26 : 185-189.
- Suttle C.A. & Chan A.M. 1993. — Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus* : abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92 : 99-109.
- Suttle C.A. 1993. — Enumeration and isolation of viruses. In : Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B. & Cole J.J., eds. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Boca Raton, Lewis Publishers, 121-134.
- Suttle C.A. 1994. — The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb. Ecol.* 28 : 237-243.
- Suttle C.A., Chan A.M. & Cottrell M.T. 1990. — Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* 347 : 467-469.
- Van Etten J.L., Lane L.C. & Meints R.H. 1991. — Virus and virus-like particles of eukaryotic algae. *Microbiol. Rev.* 55 : 586-620.
- Weinbauer M.G. & Peduzzi P. 1995. — Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in the northern Adriatic Sea. *J. Plankton Res.* 17 : 1851-1856.