

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

Spécialité : Océanographie Biologique et Environnement Marin

Présentée par

Jean-Christophe AUGUET

LES COMMUNAUTES VIRALES DE L'ESTUAIRE DE LA  
CHARENTE :

ETUDE DES DYNAMIQUES

ET

Thèse dirigée par :

Mr le professeur Gérard Blanchard

Soutenue à La Rochelle devant le jury composé de :

Composition du jury :

Mr J.-C. Nicolas, Professeur, Faculté de médecine de Saint Antoine (Paris 6)	Rapporteur
Mr T. Sime Ngando, Chargé de recherche, UMR CNRS 6023	Rapporteur
Mr G. Blanchard, Professeur, Université de La Rochelle (Directeur de thèse)	Examineur
Mlle H. Montanié, Maître de conférence, Université de La rochelle (Responsable scientifique)	Examineur
Mr D. Delmas, Chercheur IFREMER, CREMA UMR 10, (responsable scientifique)	Examineur
Mr F. Rassoulzadegan, Directeur de recherche, LOV UMR 7093	Examineur

UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

Spécialité : Océanographie Biologique et Environnement Marin

Présentée par

Jean-Christophe AUGUET

LES COMMUNAUTES VIRALES DE L'ESTUAIRE DE LA  
CHARENTE :

ETUDE DES DYNAMIQUES

Thèse dirigée par :

M. le professeur Gérard Blanchard

Soutenue à La Rochelle devant le jury composé de :

Composition du jury :

M. J.-C. Nicolas, Professeur, Faculté de médecine de Saint Antoine (Paris 6)	Rapporteur
M. T. Sime Ngando, Chargé de recherche, UMR CNRS 6023	Rapporteur
M. G. Blanchard, Professeur, Université de La Rochelle (Directeur de thèse)	Examineur
Mlle H. Montanié, Maître de conférence, Université de La rochelle (Responsable scientifique)	Examineur
M. D. Delmas, Chercheur IFREMER, CREMA UMR 10, (responsable scientifique)	Examineur
M. F. Rassoulzadegan, Directeur de recherche, LOV UMR 7093	Examineur

« N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès.  
Essayez de devenir un homme qui a de la valeur. »

Albert Einstein

A mes parents

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mademoiselle Hélène Montanié qui m'a encadr e durant ces trois années et demie de thèse avec beaucoup de patience et de disponibilité. Merci de m'avoir fait découvrir l'écologie virale et de m'avoir initi e à de nombreuses techniques comme la microscopie électronique à transmission. Je tiens également à remercier Monsieur Daniel Delmas pour ses conseils toujours forts judicieux, son aide dans les mesures d'activité bactérienne et surtout son humour. Merci également à Monsieur Gérard Blanchard pour avoir accept e d'être mon directeur de thèse et m'avoir accueilli dans le laboratoire de biologie et environnement marins de l'université de La Rochelle.

Je souhaite également remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et apporter une critique ce travail de recherche : Messieurs T el sphore Sime Ngando, Jean-Claude Nicolas et Fereidoun Rassoulzadegan ainsi que mon directeur de thèse et mes responsables scientifiques.

Je remercie le conseil général de Charente Maritime pour la bourse doctorale dont j'ai bénéficié.

Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance à Monsieur Philippe Lebaron pour m'avoir accueilli à l'observatoire d'océanographie de Banyuls ainsi que pour son aide dans la rédaction d'articles. Merci également à Philippe, Chantal, Emilio et ceux que j'oublie pour leur aide technique pendant mes séjours à Banyuls.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à monsieur Hans Hartmann pour m'avoir fait partager ses connaissances du terrain ainsi que pour son aide dans cette langue barbare qu'est l'anglais.

De nombreuses autres personnes sont intervenues plus ou moins directement dans cette thèse pour m'aider, alors merci à eux (Monique, Françoise, Armelle, Christine...).

Je tiens à remercier tout le personnel du LBEM pour m'avoir support e pendant ces longues années de thèse. Spécial dédicace au « fameux » bureau des doctorants (Karine, Delphine, Elise, Manu et Pierre-Yves que nous avons quitté trop tôt avec Olivier, mon compagnon d'infortune, pour pouvoir rédiger dans les meilleures conditions notre manuscrit (je ne suis pas sur que  a ait marché). Merci donc à lui pour m'avoir support e pendant un an dans cet isolement (superbe vue sur un pilier et chauffage au gaz) et n'oublie pas que c'est

moi qui pilote. Je n'oublie pas les autres doctorants avec qui nous avons fait d'excellentes soirées et ceux qui se sont échappés (Beubeu...).

Je n'oublie pas non plus les « romanos » et les « exilés », c'est vraiment rassurant d'avoir des amis tels que vous, merci à tous.

Enfin, je voudrais terminer par les personnes qui me tiennent le plus à cœur : mes parents et ma famille. Merci à vous d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir fait ce que je suis et de m'avoir laissé une totale liberté dans mes choix. Merci tout particulièrement à ma mère pour l'amour sans concession qu'elle me porte.

Re-enfin, je termine par celle qui est dans mon cœur, Ludivine, merci de supporter mon sale caractère.

# SOMMAIRE

<i>Introduction générale</i>	<i>1</i>
------------------------------	----------

## *PARTIE 1 : Etat de l'art*

### *Les virus: un compartiment majeur au sein des réseaux microbiens aquatiques*

<b>1. Introduction</b>	<b>5</b>
<b>2. Caractéristiques du virioplancton</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Classification</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Morphologie et distribution de taille</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Abondance et distribution</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Diversité</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Caractéristiques des hôtes</b>	<b>12</b>
<b>3. Maintien des abondances virales dans l'environnement</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Production virale</b>	<b>12</b>
3.1.1. Cycle de multiplication des virus	14
3.1.2. Spectre d'hôtes potentiels	15
3.1.3. Abondance et état physiologique des cellules hôtes	16
3.1.4. Paramètres environnementaux	17
<b>3.2. Processus de pertes</b>	<b>18</b>
3.2.1. Mortalité des virus	18
3.2.2. Défenses anti-virus et résistance des bactéries	20
<b>4. Infection virale et conséquences environnementales</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Implication dans les cycles biogéochimiques</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Impact des virus sur le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Contrôle de l'abondance et maintien de la diversité des cellules hôtes</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Transfert de matériel génétique</b>	<b>27</b>

## *PARTIE 2 : Matériels et méthodes*

<b>1. Le site d'étude</b>	<b>30</b>
<b>1.1. Le bassin de Marennes Oléron</b>	<b>30</b>
<b>1.2. La Charente</b>	<b>32</b>
<b>1.3. Dynamique des paramètres hydrologiques de la Charente</b>	<b>34</b>
1.3.1. Les débits	34
1.3.2. Marée dynamique	34
1.3.3. Marée saline	35
<b>2. Stratégie d'échantillonnage</b>	<b>35</b>
<b>2.1. Choix des stations de prélèvement</b>	<b>35</b>
<b>2.2. Validation de la stratégie d'échantillonnage</b>	<b>37</b>
<b>3. Mesure des paramètres microbiologiques</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Abondance microbienne</b>	<b>39</b>
3.1.1. Microscopie en épifluorescence	39
3.1.2. Mesure des abondances bactériennes par cytométrie de flux (CMF)	40
<b>3.2. Analyse morphologique et morphométrique du virioplancton</b>	<b>42</b>
3.2.1. Concentration et purification des particules virales	42
3.2.2. Préparation des grilles de microscopie	43
3.2.3. Mesure de la diversité morphologique et morphométrique	43
<b>3.3. Analyse de la diversité génomique du virioplancton</b>	<b>44</b>
3.3.1. Purification et concentration des particules virales	44
3.3.2. Préparation des plugs et migration des génomes viraux	46
3.3.3. Acquisition et traitement des profils électrophorétiques	47
<b>3.4. Diversité bactérienne</b>	<b>48</b>
<b>3.5. Activité bactérienne</b>	<b>50</b>
3.5.1. Production bactérienne	50
3.5.2. Activité ecto-protéolytique (AEP)	51
<b>4. Paramètres environnementaux et physico-chimiques</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Dosages des pigments chlorophylliens</b>	<b>52</b>
<b>4.2. Mesure des matières en suspension (MES)</b>	<b>53</b>
<b>4.3. Dosage des sels nutritifs</b>	<b>53</b>



4.4. Estimation du carbone organique dissous (COD)	53
4.5. Paramètres physico-chimiques	54
5. <i>Suivi mensuel</i>	54
6. <i>Expérimentations in vitro</i>	55

*Partie 3 : Etude in situ*  
*Dynamique et structure des communautés virales*  
*de l'estuaire de la Charente et du bassin de Marennes Oléron*

<b>1. Introduction</b>	<b>58</b>
<b>2. Dynamic of virioplankton abundance and its environmental control in the Charente Estuary (France)</b>	<b>59</b>
<b>2.1. Abstract</b>	<b>59</b>
<b>2.2. Introduction</b>	<b>60</b>
<b>2.3. Materials and methods</b>	<b>61</b>
2.3.1. Study site	61
2.3.2. Sampling strategy	63
2.3.3. Physical and chemical parameters	63
2.3.4. Viral and bacterial abundance	64
2.3.5. Bacterial activities	65
2.3.6. Statistical analyses	65
<b>2.4. Results</b>	<b>66</b>
2.4.1. Environmental dynamics	66
2.4.2. Spatio-temporal distribution of microorganisms	71
2.4.3. Relationships between virus and biotic / abiotic parameters	73
2.4.4. Bacterial activities	73
<b>2.5. Discussion</b>	<b>76</b>
2.5.1. Microbial abundance along the estuary	76
2.5.2. Temporal dynamics: influence of temperature	77
2.5.3. Spatial dynamics: influence of water mixing and river discharge	79
2.5.4. Nutrient bioavailability and viral loop	81
<b>3. Structure of virioplankton in the Charente Estuary (France): transmission electron microscopy versus pulsed field gel electrophoresis</b>	<b>83</b>
<b>3.1. Abstract</b>	<b>83</b>
<b>3.2. Introduction</b>	<b>84</b>
<b>3.3. Materials and methods</b>	<b>86</b>
3.3.1. Sample collection	86
3.3.2. Virioplankton concentration	86
3.3.3. Morphology (shape and size) and abundance of the VLP	88

3.3.4.	Structure analysis of VLG	89
<b>3.4.</b>	<b>Results</b>	<b>91</b>
3.4.1.	Methodological consideration	91
3.4.2.	Morphological structure of the virioplankton	91
3.4.3.	VLG structure of the virioplankton	96
<b>3.5.</b>	<b>Discussion</b>	<b>98</b>
3.5.1.	Methodological considerations	98
3.5.2.	Virioplankton diversity	100
3.5.3.	Did TEM and PFGE provide comparable information?	104
3.5.4.	Changes in virioplankton structure along the salinity gradient	104
3.5.5.	Temporal changes in virioplankton structure	105
<b>4.</b>	<b>Synthèse</b>	<b>107</b>

## Partie 4 : Etude in vitro

### *Influence des particules virales dulçaquicoles sur les populations bactériennes du bassin de Marennes Oléron*

<b>1. Introduction</b>	<b>112</b>
<b>2. Effects of riverine viroplankton on marine bacterial productivity in the Bay of Marennes-Oléron (France)</b>	<b>115</b>
<b>2.1. Abstract</b>	<b>115</b>
<b>2.2. Introduction</b>	<b>115</b>
<b>2.3. Methods</b>	<b>116</b>
2.3.1. Study site and Sampling	116
2.3.2. Preparation of viral concentrate and grazer free water	117
2.3.3. Preliminary experiment set up	117
2.3.4. Virus standard addition experiments (VSAE)	119
2.3.5. Enumeration of virus and bacteria	121
<b>2.4. Results and discussion</b>	<b>123</b>
2.4.1. Preliminary experiments	123
2.4.2. Virus standard addition experiment (VSAE)	125
<b>3. Influence des virus dulçaquicoles sur la composition des communautés bactériennes et virales côtières</b>	<b>129</b>
<b>3.1. Protocole expérimental</b>	<b>129</b>
3.1.1. Préparation des fractions d'eau	129
3.1.2. Assemblage des fractions	130
3.1.3. Variables mesurées	131
3.1.4. Statistiques	133
<b>3.2. Resultats</b>	<b>135</b>
3.2.1. Caractéristiques du milieu	135
3.2.2. Dynamique des abondances microbiennes	137
3.2.3. Dynamique des paramètres bactériens	141
3.2.4. Evolution des concentrations en sels nutritifs et du COD	143
3.2.5. Relations entre abondances microbiennes et paramètres biotiques / abiotiques	145
3.2.6. Influence des traitements sur la composition de la communauté bactérienne	146
3.2.7. Influence des traitements sur la composition de la communauté virale	150
<b>3.3. Discussion</b>	<b>154</b>

3.3.1.	Considérations méthodologiques	154
3.3.2.	Cinétiques microbiennes	156
3.3.3.	Evolution de la composition des communautés bactériennes et virales	161
<b>4.</b>	<b>Synthèse</b>	<b>167</b>
	<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>169</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>174</b>

## Introduction générale

L'anthropisation des zones humides n'a cessé de croître depuis que l'homme a su domestiquer l'élément liquide. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas des estuaires et des zones côtières qui subissent directement les pressions anthropiques liées à leur exploitation.

Les estuaires sont des étendues d'eaux côtières semi-fermées, qui ont une connexion libre avec l'océan et dans lesquelles l'eau de mer est progressivement diluée par de l'eau douce provenant du drainage continental (Pritchard 1967). Cette définition, qui est la plus utilisée pour définir le milieu estuarien, fait apparaître le concept de gradients environnementaux caractéristique essentielle de l'écosystème estuarien. En effet, ces écosystèmes sont de fascinants milieux permettant aux biologistes d'étudier les adaptations physiologiques de la faune et de la flore face à des gradients environnementaux tels que la salinité.

Peu d'espèces sont capables d'adapter leur physiologie à de tels gradients environnementaux, ce qui entraîne au niveau des estuaires une réduction de la biodiversité par rapport aux écosystèmes marins et dulçaquicoles voisins (McLusky 1989). Paradoxalement, les études menées par Odum (1978) ont montré que les estuaires constituent les écosystèmes présentant la plus forte productivité et les abondances spécifiques les plus fortes parmi tous les écosystèmes existants. Ce paradoxe s'explique par des apports en quantité suffisante de nutriments véhiculés par les eaux fluviales et provenant du lessivage des sols des bassins versants par les précipitations, et par une faible compétition interspécifique.

Les fleuves, outre les nutriments minéraux et la MOD (matière organique dissoute) qu'ils déversent dans le milieu côtier, charrieraient également d'importante quantité de particules virales dans la mesure où les concentrations en virus dans les eaux douces varient entre  $10^6$  et  $10^8$  virus  $\text{ml}^{-1}$  (Wommack et Colwell 2000). Les abondances virales dans les océans et les zones côtières étant en moyenne inférieures d'un facteur 10 aux abondances virales dulçaquicoles, ces apports fluviaux ne sont donc pas négligeables.

La transformation des composés organiques dissous en biomasse carbonée utilisable par le réseau trophique et la régénération de nutriments disponibles pour le phytoplancton sont

essentiellement assurées par les bactéries hétérotrophes, ce que traduit le concept de la boucle microbienne. De part sa forte abondance, le bactérioplancton constitue le compartiment planctonique le plus exposé aux attaques virales (Fuhrman 1999, Suttle 1999). Par leur activité lytique, les virus sont capables d'agir directement sur le fonctionnement de la boucle microbienne et détourneraient de 6 à 26 % du carbone produit par photosynthèse (Wilhelm et Suttle 1999). Outre leur action dans les cycles biogéochimiques en général, les virus seraient également impliqués dans le contrôle de l'abondance et de la diversité des populations planctoniques (Suttle, 1999; Fuhrman, 1999) notamment bactériennes, ainsi que dans les transferts de matériel génétique entre leurs hôtes potentiels (Jiang, 1998).

Le bassin de Marennes Oléron constitue le centre conchylicole le plus important d'Europe de part son stock d'huître et sa production d'huîtres. Les principaux apports d'éléments nutritifs et de MOD au niveau du bassin sont effectués par les fleuves Charente, Seudre, et épisodiquement par les eaux de la Gironde lors de crues hivernales.

De part une économie résolument orientée vers la production conchylicole, toutes les études écologiques ayant trait au bassin de Marennes Oléron concerne les relations huître-milieu. Toutes s'accordent à démontrer l'importance de la Charente dans les apports d'origine continentale au niveau des zones de production ostréicole. Ravail-Legrand (1993) a démontré que les eaux de la Charente, par leurs apports en nutriments, contribuaient significativement à la productivité phytoplanctonique du bassin.

Cette thèse s'inscrit dans un projet global visant à estimer l'influence des composés dissous (minéraux et organiques) et des particules virales apportées par la Charente sur la productivité du bassin de Marennes Oléron. **Le travail présenté ici se focalise sur l'étude des communautés virales de l'estuaire de la Charente et s'intéresse plus particulièrement à l'influence des virus dulçaquicoles transportés par la Charente sur la dynamique et la composition des populations bactériennes du bassin.**

Ce travail repose essentiellement sur deux grandes questions qui vont structurer ce manuscrit :

Y a-t-il un apport de particules virales par la Charente dans le bassin de Marennes Oléron ? Et si oui, quels sont les flux de particules virales de la rivière vers le bassin ?

Les particules virales conservent-elles leur virulence lors de l'estuaire? Et si oui, quelles sont les conséquences de ces infections virales en termes de dynamique et de composition des communautés bactériennes ?

**La première partie** de ce mémoire est consacrée à une étude bibliographique reprenant l'ensemble des connaissances actuelles en écologie virale.

**La deuxième partie** répertorie de manière exhaustive l'ensemble des méthodes et du matériel utilisés lors de cette étude. Le site d'étude est également présenté en détail.

**Les chapitre 2 et 3 de la troisième partie** sont consacrés à l'étude descriptive du virioplancton dans l'estuaire de la Charente. **Le chapitre 2**, présenté sous forme de publication en anglais, est actuellement sous presse dans *Microbial Ecology* et concerne la dynamique des abondances du virioplancton le long du gradient de la salinité de la Charente ainsi que son contrôle par les variables environnementales. **Le chapitre 3** est également présenté sous forme de publication en anglais actuellement soumise à *Microbial Ecology*. Il s'intéresse à la dynamique de la diversité virale le long du gradient de salinité de la Charente.

**Les chapitres 2 et 3 de la quatrième partie** portent sur des expériences d'enrichissement viral *in vitro*. **Le chapitre 2**, rédigé sous forme d'une publication en anglais actuellement soumise à *Journal of Plankton Research*, est consacré à l'étude de la réponse à court terme de communautés bactériennes côtières soumises à l'action de concentrats viraux. L'étude des conséquences de l'addition de concentrats viraux de types différents (dulçaquicole et côtier) sur la composition des communautés bactériennes côtières constitue la trame du **chapitre 3** de cette quatrième partie.



# PARTIE 1 : Etat de l'art

Les virus : un compartiment majeur au sein des réseaux microbiens  
aquatiques

# 1. Introduction

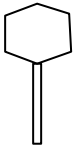
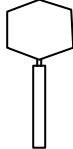

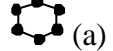

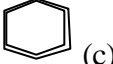

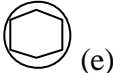





Si le terme «virus » fait référence à quelque chose de négatif dans notre inconscient, c'est pourtant de l'étude de leur biologie et de leur génétique qu'est née l'une des plus décisive découverte de la biologie : le port de l'information génétique par la molécule d'ADN. L'écologie virale est la science qui s'intéresse aux interactions entre les virus et les autres organismes ainsi qu'aux interactions virus- environnement. Malgré la découverte en 1955 du premier virus d'origine marine (i.e. *Photobacterium phosphorium*, Spencer 1955), nous ne possédons que très peu d'informations sur l'écologie des virus en milieu aquatique.

Le parasitisme intracellulaire obligatoire des virus ne permet pas leur culture sur milieux nutritifs comme ceux utilisés en bactériologie. Leur culture ne peut se faire qu'à l'intérieur d'un animal vivant ou d'un végétal, d'un œuf embryonné ou de cultures cellulaires *in vitro* pour les virus d'eucaryotes et de bactéries pour les bactériophages. Or, dans le cas des bactériophages, très peu de bactéries marines sont cultivables actuellement. De plus les méthodes de titrage par plaque de lyse ne donnaient que des concentrations virales faibles en milieu aquatiques. Tout cela contribua pendant de nombreuses années à laisser supposer que les virus étaient rares et ne jouaient pas un rôle important dans les réseaux trophiques microbiens aquatiques.

C'est l'utilisation des méthodes directes de comptage des bactéries qui a permis de mettre en évidence la très grande abondance des virus en milieu aquatique. En 1979, une première étude utilisant la microscopie électronique à transmission (MET), fait état d'une concentration en particules d'allures virales (PAV)  $> 10^4 \text{ ml}^{-1}$  dans la fraction  $> 0.2 \mu\text{m}$  du plancton de la baie de Yaquina, Oregon (Torrella et Morita 1979). Ce résultat fut un début de preuve supportant les hypothèses émises 11 ans plus tôt par Weibe et Liston (1968). Ces auteurs avaient suggéré dès 1968, que les bactériophages (virus de bactérie) pouvaient agir sur la diversité des populations bactériennes et favoriser les échanges de matériel génétique. Cependant ce n'est que dans les années 90, après confirmation de leur grande abondance, dépassant d'un facteur 10 les abondances bactériennes (Proctor et al. 1988, Bergh et al. 1989), et après démonstration de la mortalité de certains membres des réseaux microbiens aquatiques

suite à des lyses virales (Proctor et al. 1988, Proctor et Fuhrman 1990) que commencent réellement les investigations sur le rôle des virus au sein des écosystèmes aquatiques.

Tableau 1.1 : Classification et représentation schématique des bactériophages (d'après Ackermann 2003)

Bactériophages						
Forme	Caudés			Isométriques (icosaédraux)	Filamenteux	Pléomorphes
Ordre	Caudovirale					
Famille	Siphoviridae	Myoviridae	Podoviridae	Microviridae (a) Corticoviridae (b) Tectiviridae (c) Leviviridae (d) Cystoviridae (e)	Inoviridae (f) Lipothrivrividae (g) Rudiviridae (h)	Plasmaviridae (i) Fuselloviridae (j)
Représentation schématique				 (a)  (b)  (c)  (d)  (e)	 (f)  (g)  (h)	 (i)  (j)

Aujourd'hui, les virus sont considérés comme des membres actifs des réseaux microbiens avec des rôles aussi importants que la régulation de la diversité et de l'abondance des populations microbiennes, le transfert de gènes parmi ces populations et la participation aux cycles biogéochimiques.

## 2. Caractéristiques du virioplancton

### 2.1. Classification

L'absence de métabolisme biochimique rend la classification des virus dans le règne vivant délicate. Récemment un nouveau domaine biologique nommé *akamara* (acellulaire en grec) vient d'être proposé pour regrouper tous les éléments acellulaires infectieux possédant un génome (Hurst 2000). Actuellement, l'ICTV (International Council for Taxonomy of Viruses) recense 3 ordres, 56 familles et 233 genres (Van Regenmortel et Fauquet 2000).

Avec 5300 bactériophages observés au microscope électronique, les virus de bactéries constituent le groupe viral le plus étudié. Les bactériophages sont constitués d'un ordre (*Caudovirales*), 13 familles et 30 genres (Ackermann 2003, Tableau 1.1). Les bactériophages appartenant à l'ordre *Caudovirales* possèdent tous une queue (plus ou moins longue) et constituent 96 % des bactériophages connus. Les virus de cet ordre sont les seuls virus que l'on peut classer dans le groupe des bactériophages sur le seul critère de leur morphologie.

### 2.2. Morphologie et distribution de taille

Les virus forment un groupe très hétérogène. Ce sont des particules de tailles colloïdales composées au minimum d'une coque protéique (capside) contenant un génome ADN ou ARN à double ou simple brin. Leur morphologie peut être aussi simple que celle des *Leviviridae* (Tableau 1.1) qui ne comportent qu'une capsidie icosaédrique ou bien aussi complexe que celle des *Myoviridae* qui possèdent une capsidie icosaédrique reliée par l'intermédiaire d'un collier à une queue contractile constituée à son extrémité d'une plaque basale associée à des spicules et des fibres (Matthews 1980). Certaines familles virales se caractérisent par la présence d'une enveloppe glycoprotéique (e. g. *Cystoviridae* et

*Plasmaviridae*). Enfin, des projections ou spicules ornent les virions de certaines familles (e. g. *Microviridae*).

Le développement de la microscopie électronique à transmission a permis d'accéder à la diversité morphologique des virus (Adams 1953, Huxley 1956). A l'exception des lacs alpins présentant une forte proportion de virus filamenteux, la grande majorité des PAV présentent une capsidie icosaédrique avec présence ou absence d'une queue. De nombreuses études concernent la morphologie des virus caudés marins (Frank et Moebus 1987, Børsheim 1993, Demuth et al. 1993). La dominance du virioplancton par les virus caudés (Demuth et al. 1993) ou non caudés (Hara et al. 1991, Wommack et al. 1992) reste en suspens puisque les deux cas de figures ont été retrouvés dans le milieu naturel. Toutefois, la séparation entre queue et capsidie lors des préparations microscopiques pourrait être à l'origine des faibles proportions de bactériophages caudés dans certains échantillons naturels (Proctor 1997).

A l'instar de la morphologie, les tailles de capsides varient fortement dans un même échantillon. De nombreuses études ont donc utilisé ce paramètre comme descripteur du virioplancton (Wommack et Colwell 2000 et références à l'intérieur). Malgré la présence ponctuelle de virus « géants » (capsidie variant de 200 à 700 nm, Peduzzi et Weinbauer 1993b, Jiang et Paul 1994), la distribution de fréquence des diamètres de capsides montre qu'environ 65 % du virioplankton est dominé par la classe de taille 30 – 60 nm pour une moyenne variant de 55 à 64 nm dans les écosystèmes marins (Weinbauer 2004). Les variations spatio-temporelles dans la distribution des tailles de capsides ont permis de mettre en évidence une dynamique dans la composition du virioplankton et, par inférence, celle de leurs populations hôtes (Cochlan et al. 1993, Weinbauer et Peduzzi 1994).

### 2.3. Abondance et distribution

Outre leur ubiquité, c'est le paramètre abondance qui a rendu les virus intéressants aux yeux des écologues microbiens. Les abondances virales dénombrées dans divers écosystèmes aquatiques varient de  $< 10^4$  à  $10^8$  virus  $\text{ml}^{-1}$  (Wommack et Colwell 2000) et dépassent souvent les abondances bactériennes d'un facteur 10. Les abondances virales présentent des amplitudes de variations supérieures à celles des bactéries confirmant une forte activité virale au sein des réseaux microbiens aquatiques. Il existe une littérature importante documentant les variations temporelles des abondances virales de l'échelle des heures à celle des mois (Bergh et al. 1989, Wommack et al. 1992, Weinbauer et al. 1993, Jiang et Paul 1994, Suttle et Chan

1994, Hennes et Simon 1995, Mathias et al. 1995, Weinbauer et al. 1995, Bratbak et al. 1996, Maranger et Bird 1996, Hofer et Sommaruga 2001, Bettarel et al. 2002, Fischer et Velimirov 2002, Hwang et Cho 2002, Montanié et al. 2002, Wilhelm et al. 2002, Bettarel et al. 2003). Plusieurs de ces études ont permis de mettre en évidence une augmentation significative des abondances virales à la suite de blooms phytoplanctoniques suggérant ainsi une étroite relation entre abondances virales et croissance (et production) de leurs populations hôtes (Bratbak et al. 1990, Hennes et Simon 1995, Weinbauer et al. 1995, Larsen et al. 2001).

Spatialement, les abondances virales dépendent de l'état trophique et donc de la productivité de l'écosystème (Heldal et Bratbak 1991, Cochlan et al. 1993, Maranger et Bird 1995). La réalisation de transect de la zone côtière vers le large a notamment permis de montrer une décroissance des abondances virales vers le large (Boehme et al. 1993, Cochlan et al. 1993). L'étude des distributions virales montre également de plus fortes abondances virales en milieu dulçaquicole qu'en milieu marin (Maranger et Bird 1995). Enfin, à l'intérieur de la colonne d'eau, des variations importantes d'abondances virales ont été observées notamment au large où les titres viraux chutent ( $< 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) en deçà de la zone euphotique (200 m) (Paul et al. 1991, Boehme et al. 1993, Hara et al. 1996, Steward et al. 1996). D'une manière générale, les fronts (thermocline, chemocline...) séparant deux masses d'eau présentent des maxima de concentration en nutriment, bactérioplancton et phytoplancton mais aussi en virus (Jiang et Paul 1994, Tuomi et al. 1997). Des maxima d'abondance virale ont été aussi observés dans la micro-couche de surface (20  $\mu\text{m}$ ) du lac Supérieur (Tapper et Hicks 1998).

## 2.4. Diversité

Compte tenu du fait que n'importe quel organisme est susceptible d'être infecté par un virus et que chaque virus possède un spectre d'hôtes potentiels plus ou moins important, il est raisonnable de penser que le virioplancton constitue, en abondance et en diversité, le groupe le plus important du plancton. Des centaines de virus infectant le phytoplancton ou le bactérioplancton ont déjà été isolés. Cependant, en prenant comme exemple les bactéries aquatiques, seulement 1 % de celles-ci sont cultivables actuellement (Staley et Konopka 1985). Or l'isolement de l'hôte (ou à défaut, la disponibilité de cellules sensibles et permissives) est nécessaire pour pouvoir isoler un virus, ce qui laisse penser qu'une majorité de la diversité du virioplancton reste encore inaccessible à ce jour.

Afin de contourner le problème du peu de bactéries isolables sur les milieux de cultures conventionnels, il a été fait appel à l'outil moléculaire et notamment aux réactions de polymérisation en chaîne (PCR) associées aux techniques de clonage séquençage. A partir de l'extrait d'ADN d'un échantillon, ces techniques utilisent dans la majorité des études le gène ou une portion du gène de l'ARN ribosomal (ADNr) 16S ou 18S comme identifiant de n'importe quel organisme procaryote ou eucaryote. La diversité des communautés microbiennes est donc devenue accessible (que les micro-organismes de cette communauté soient cultivables ou non). Cependant, dans le cas des communautés virales, il n'existe pas de gène commun connu entre tous les virus comme celui de l'ADNr 16S des bactéries (Hendrix et al. 1999). Toutefois, des amorces nucléiques ont pu être créées à partir de zones conservées de certains gènes viraux, mais cela ne concerne que certains groupes viraux comme les :

-*Phycodnaviridae* (marquage du gène de l'ADN polymérase, Chen et al. 1996)

-Cyanophages (marquage du gène des protéines g20 des capsides, Wilson et al. 1999).

-Picornalike virus (marquage du gène de l'ARN polymérase, Culley et al. 2003)

L'alternative a été trouvée par Wommack et al. (1999a) qui ont utilisé l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour obtenir l'empreinte génétique d'une communauté virale marine. Les génomes viraux étant compris entre 17 et 700 kb (Ackermann 2003), il est possible de les faire migrer intacts et de les séparer sur gel d'agarose. Les résultats obtenus par cette méthode démontrent l'existence de différentes tailles de génomes viraux en milieu marin (Wommack et al. 1999a, Steward et al. 2000, Fuhrman et al. 2002, Riemann et Middelboe 2002) ainsi qu'une certaine stabilité des communautés virales dans l'espace et dans le temps (Fuhrman et al. 2002, Riemann et Middelboe 2002).

Le clonage à l'aveugle du métagénome viral d'eau de Mission Bay et la comparaison avec les données de GenBank confirme qu'une grande partie de la diversité virale reste encore à caractériser (Breitbart et al. 2002). L'utilisation d'un modèle mathématique basée sur les séquences contiguës permet de prédire que le génome viral le plus abondant ne représenterait au maximum que 2 à 3 % de la communauté virale (Breitbart et al. 2002) et que l'indice de diversité serait élevé (indice de Shannon Weaver = 7.8, Paul et al. 2002).



## 2.5. Caractéristiques des hôtes

Le recoupement des différentes études réalisées à ce jour sur le virioplancton semblent indiquer qu'en milieu marin, celui-ci est dominé par les bactériophages (Wommack et al. 1992, Maranger et Bird 1995). Cette hypothèse est supportée par les fortes corrélations entre abondances bactériennes et virales (Cochlan et al. 1993, Hewson et al. 2001c), la forte abondance du bactérioplancton par rapport aux autres hôtes potentiels (phytoplancton et autres eucaryotes, Boehme et al. 1993, Cochlan et al. 1993) et la dominance du virioplancton par des tailles de capsides et de génomes correspondant à celles des bactériophages (30 – 60 nm, Hara et al. 1991, Wommack et al. 1999a). Enfin, en analysant la diversité du virioplancton par une approche métagénomique, Breitbart et al (2002) ont montré que 75 à 90 % des séquences virales identifiées par la base de données GenBank étaient proches de bactériophages. En milieu lacustre, les résultats d'une étude menée sur plusieurs lacs canadiens (Maranger et Bird 1995) suggèrent que les virus d'algues et de cyanobactéries représentent une partie significative du virioplancton dulçaquicole.

## 3. Maintien des abondances virales dans l'environnement

Les abondances virales trouvées dans les écosystèmes aquatiques résultent essentiellement d'un équilibre entre processus de production et processus de pertes (Figure 3.1).

### 3.1. Production virale

La production virale ainsi que son intensité sont dépendantes de nombreux paramètres dont les plus importants sont le cycle de multiplication des virus, le spectre d'hôtes potentiels, l'état physiologique et l'abondance des cellules hôtes et enfin les contraintes (forces) environnementales liées à chaque écosystème.

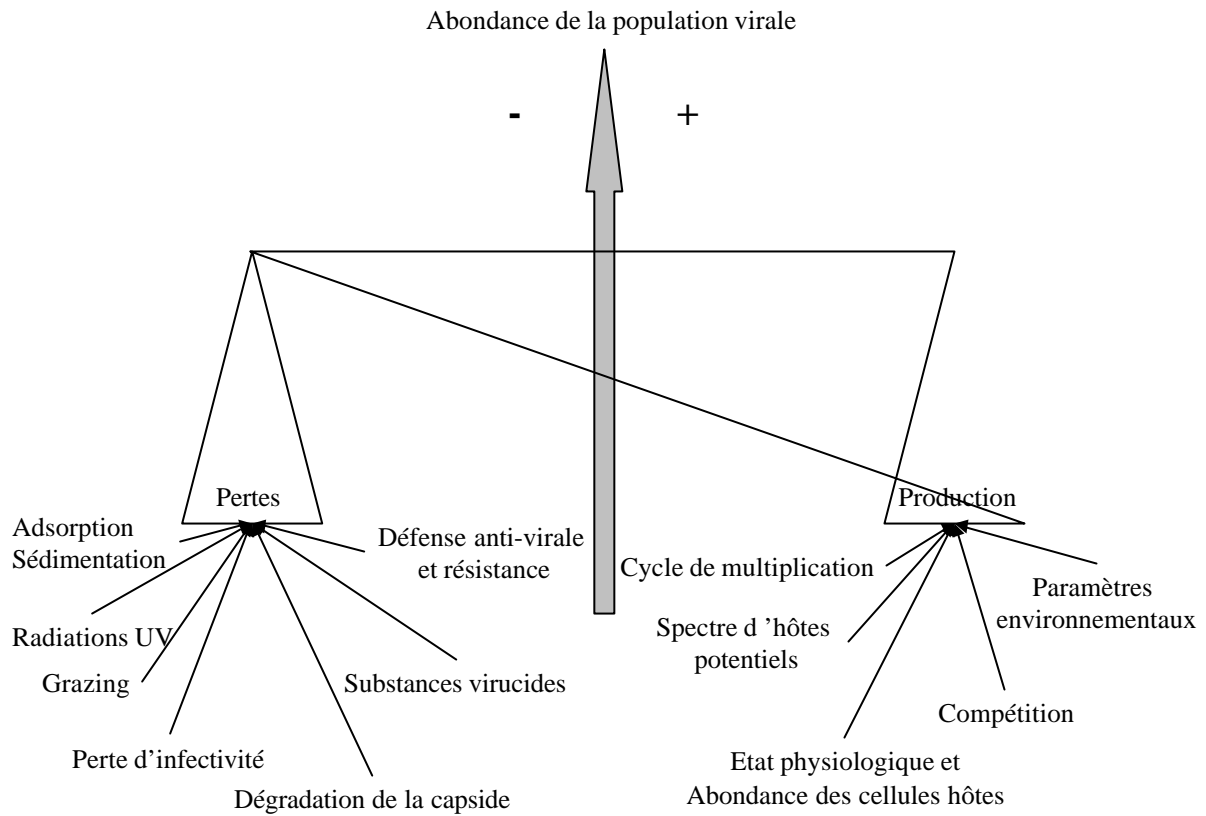


Figure 3.1 : Schéma des processus intervenant dans la persistance de l'abondance d'une population virale dans la colonne d'eau. Plusieurs de ces processus peuvent jouer à la fois sur la production et les pertes virales.

### 3.1.1. Cycle de multiplication des virus

Les virus sont des parasites obligatoires qui détournent la machinerie cellulaire de leurs hôtes pour se multiplier. L'infection virale se compose de plusieurs étapes communes à tous les virus :

- Adsorption (reconnaissance entre une cellule sensible et une particule virale)
- Pénétration du génome viral (bactériophages caudés) ou de la particule virale entière
- Décapsidation (séparation entre l'acide nucléique et la capsid)
- Expression (transcription et traduction) et réplication du génome viral
- Assemblage des particules virales
- Libération des nouveaux virions par lyse cellulaire ou par bourgeonnement

Dans le cas des bactériophages caudés, le génome traverse la paroi bactérienne sous l'effet d'un gradient de protons et / ou d'une différence de pression osmotique et / ou de protéines de transport (Letellier et al. 2003).

Deux paramètres du cycle de multiplication, la phase de latence et le *burst size* (rendement de synthèse virale), sont particulièrement étudiés en écologie virale de part leur importance dans le taux de prolifération virale (Proctor et al. 1993, Binder 1999). La phase de latence correspond à l'intervalle de temps séparant l'adsorption et l'accumulation maximale de virions juste avant la lyse cellulaire. Le *burst size* correspond aux nombres de virions produits et libérés par cellules. De nombreuses études ont utilisé un *burst size* de 50 pour déterminer la mortalité bactérienne due aux lyses virales (Heldal et Bratbak 1991, Suttle et Chen 1992, Steward et al. 1996). Cependant, le *burst size* naturel calculé à partir d'observations en MET de cellules intactes ou en coupe fine du bactérioplancton est inférieur avec 24 (10 – 87) bactériophages par bactéries (Wommack et Colwell 2000). Des *burst size* de 400 à 500 ont été obtenus pour le virus de l'algue phytoplanctonique *Emilliana Huxleyi* (Bratbak et al. 1993). Il a été démontré que le *burst size* variait en fonction de la température (Mathias et al. 1995), de l'état trophique du milieu (Weinbauer et al. 1993) et du type de bactéries (coque, bacille..., Weinbauer et al. 1993, Weinbauer et Peduzzi 1994, Mathias et al. 1995).

Différents cycles de multiplications caractérisent les virus : lytique, lysogénique, pseudolysogénique et chronique. Le cycle lytique aboutit, après infection, à la libération de nouveaux virions entraînant la destruction de la cellule hôte. Dans le cas du cycle lysogénique, le génome viral d'un virus tempéré s'intègre au génome de l'hôte et reste en dormance jusqu'à l'induction d'un cycle lytique par un stimulus extérieur (UV, variation de température, stress chimique ou métabolique...). Le cycle chronique conduit à la libération de nouveaux virus par bourgeonnement sans destruction de la cellule hôte. Enfin dans le cas de la pseudolysogénie, l'acide nucléique viral ne s'intègre pas à celui de la cellule hôte, il n'est pas répliqué et n'est pas réparti de manière égale au moment de la division cellulaire : il reste inactif jusqu'à ce que le niveau énergétique de la cellule soit suffisant pour permettre la réplication.

Ces différents cycles de multiplication offrent des avantages différents quant à la persistance des virus lytiques (virulents) ou tempérés. Celle des virus lytiques dépend d'un taux de contact important entre virus et cellules hôtes et donc d'une forte densité de ces dernières (Weinbauer et Suttle 1996). Les virus lysogènes sont indépendants de la densité en cellule hôte et ne requièrent que la présence de quelques cellules hôtes lysogènes ainsi qu'un facteur induisant ponctuellement un cycle lytique pour permettre la production de nouveaux virions (Bergh et al. 1989, Weinbauer et Suttle 1996). Suivant ce raisonnement, la lysogénie devrait donc dominer dans les systèmes oligotrophes alors que les infections lytiques devraient prévaloir dans les systèmes eutrophes. Cependant, étant donnée la difficulté d'estimer la proportion de virus lysogènes dans un échantillon naturel, la prévalence d'une stratégie par rapport à l'autre dans les milieux aquatiques reste discutée.

Un autre avantage de la lysogénie est l'acquisition par les cellules lysogènes d'une immunité vis à vis de la superinfection (infection supplémentaire par le même type de virus, Ackermann 1987) et vis à vis de la co-infection. Le prophage  $\epsilon$  de *Salmonella* par exemple, code pour des enzymes qui modifient les polysaccharides de l'enveloppe cellulaire empêchant l'infection par d'autres bactériophages du même type (Campbell 1994b, 1994a).

### 3.1.2. Spectre d'hôtes potentiels

Il est coutume de penser que chaque virus possède son hôte spécifique. Cependant, de nombreuses études montrent l'existence de virus polyvalents (à large spectre d'hôtes pouvant appartenir à des souches ou à des espèces différentes) notamment chez les cyanophages

(Safferman et Morris 1963, Safferman et al. 1972, Suttle et Chan 1993, Waterbury et Valois 1993) mais aussi dans le cas des bactériophages (Wichels et al. 1998). Il semblerait qu'en milieu océanique, le spectre d'hôtes potentiels des bactériophages soit plus large que dans les systèmes plus eutrophes (Moebus 1992). Cela peut être vu comme une stratégie adaptative permettant d'augmenter les chances d'infection et donc de persistance des bactériophages lorsque le bactérioplancton présente des abondances faibles. Cependant il n'existe pas encore assez de données sur ce sujet pour pouvoir conclure sur le contrôle exercé par les conditions environnementales sur le spectre d'hôtes potentiels.

### 3.1.3. Abondance et état physiologique des cellules hôtes

Le maintien d'une concentration stable en virus de type virulent suppose l'existence d'une concentration en cellules hôtes suffisante pour permettre un taux de contact et une production virale supérieurs aux mécanismes d'inactivation et de mortalité. Afin de déterminer la valeur seuil à partir de laquelle la densité en cellules hôtes ne peut plus soutenir une population virale stable, un modèle transport diffusif décrivant les taux de contact virus-hôte a été créé (Murray et Jackson 1992). Ce modèle a notamment permis d'une part de montrer l'effet positif de la motilité des cellules hôtes sur l'étape d'adsorption et d'autre part une diminution du titre viral due à l'adsorption sur des matières en suspension. Utilisant ce modèle, il a été démontré qu'en milieu naturel, le produit des concentrations virales et bactériennes doit être  $> 10^{12}$  pour pouvoir permettre la production virale (Wilcox et Fuhrman 1994). Des expérimentations *in vitro* ont permis de calculer des densités seuils de cellules hôtes ( $10^2$  et  $10^4$  cellules  $\text{ml}^{-1}$ ) à partir desquelles il n'y avait plus de production virale (Wiggins et Alexander 1985, Kokjohn et al. 1991). L'existence de seuils identiques a pu être dérivée d'études sur des communautés naturelles virales et procaryotes (Steward et al. 1992, Weinbauer et Peduzzi 1994).

De part son influence sur le temps de latence et sur le *burst size*, l'état physiologique des cellules hôtes est un paramètre important de la prolifération virale. Cette dernière est d'autant plus grande que les conditions de croissance des cellules hôtes sont optimales (Lenski 1988). Or, les bactéries dans leurs écosystèmes sont considérées comme étant dans une phase de croissance correspondant à la phase stationnaire des courbes de croissances bactériennes classiques (Kolter et al. 1993). D'après Wilhelm et Suttle (1999), seulement 30% des bactéries marines sont viables et métaboliquement actives. Une augmentation de la période de latence entraîne un retard de la lyse cellulaire et une réduction du *burst size* lors

d'infections virales de bactéries en phase stationnaire de croissance ou en état de manque nutritionnel (Propst-Ricciuti 1976, Kokjohn et al. 1991). Ce délai dans la lyse cellulaire peut être vu comme une période d'attente de conditions plus favorables à la prolifération virale (Wommack et Colwell 2000).

#### 3.1.4. Paramètres environnementaux

Malgré leur absence de métabolisme (constat récemment remis en question par la découverte de gènes codant pour des ARNt et des enzymes intervenant dans la translation chez les mimivirus, gros virus d'amibes, Scola et al. 2003), les virus, au travers de leurs cellules hôtes, sont soumis aux contrôles exercés par les variations de divers paramètres environnementaux (apports en nutriments, température, changements physico-chimiques) au niveau de leur niche écologique. Quelques travaux ont montré un effet négatif de concentrations limitantes en phosphate et nitrate sur la prolifération virale (Bratbak et al. 1993, Wilson et al. 1996). De même, l'addition de nutriments inorganiques (Tuomi et al. 1995, Wilson et al. 1996, Hewson et al. 2001c) et de saccharose (Tuomi et Kuuppo 1999) semble stimuler la prolifération et l'abondance virale. Tous ces éléments chimiques forment aussi un environnement ionique qui peut agir sur l'adsorption, la réplication, l'activité lytique ou la persistance des virus (Moebus 1987). Les particules virales et les bactéries formant des colloïdes chargés électriquement, le pH de la niche écologique joue un rôle dans la nature des charges portées et dans l'intensité des forces de répulsion lors de la phase d'adsorption (Weinbauer 2004). L'adsorption virale sur les récepteurs cellulaires est régie par des forces électrostatiques, des forces de Van der Waals et des interactions hydrophobes modulées par la force ionique et le pH du milieu.

La température est considérée comme une variable forçante majeure qui peut agir directement sur les virus (Weibe et Liston 1968) ou indirectement en modulant la croissance des cellules hôtes. La température agirait aussi sur la pénétration des particules virales (ou du génome seul) à l'intérieur des cellules hôtes en modifiant la fluidité de leur membrane (Forde et Fitzgerald 1999). Des virus sont trouvés dans des environnements aussi extrêmes que les glaces polaires, les sources hydrothermales, les marais salants ..., Kim Juniper et al. 1998, Geslin et al. 2003, Gowing 2003).

La lumière peut aussi influencer la prolifération virale en favorisant l'adsorption aux cellules hôtes (Suttle 2000) et, aux travers des UV-A, en permettant la photo-réparation des

dommages subis par l'ADN viral par les UV-B. La formation de dimères de pyrimidine cyclobutane constitue le principal dommage liée aux radiations UV au niveau de l'ADN viral (Weinbauer 2004). Ces dimères de pyrimidine cyclobutane peuvent être éliminés à l'intérieur des cellules hôtes par l'enzyme photolyase (photoréactivation) après activation de celle-ci par des radiations UV de longueur d'onde de 365 – 445 nm (UV-A, Friedberg et al. 1995). Par ailleurs, certains virus possèdent les gènes codant pour leur propre système de réparation. C'est le cas notamment des gènes viraux codant pour l'endonucléase *den V* (Furuta et al. 1997) et l'enzyme *recA* (Shaffer et al. 1999) qui interviennent dans des mécanismes de réparation non photo dépendant (e. g. système de réparation SOS) fonctionnant à l'obscurité et nécessitant de l'ATP (Friedberg et al. 1995).

Les facteurs physiques comme le vent, les courants ou les turbulences agissent surtout sur la distribution des particules virales et par conséquent sur les taux de contact, qui seront favorisés dans un environnement dynamique. Les virus étant 10 à 1000 fois plus abondants dans les sédiments que dans la colonne d'eau (Paul et al. 1993, Maranger et Bird 1996, Steward et al. 1996, Hewson et al. 2001c), les phénomènes de remises en suspension lors du cycle des marées, de coup de vent ou de crues peuvent être une source d'enrichissement viral de la colonne d'eau. Inversement, les phénomènes d'adsorption des virus sur les matières en suspension peuvent être une source importante de diminution des abondances virales dans la colonne d'eau après sédimentation (Gerba et Schaiberger 1975, Noble et Fuhrman 1997). De plus si l'adsorption sur des surfaces métalliques peut favoriser l'inactivation virale, l'association des virus avec des MES est généralement observée comme protectrice vis à vis de la photoinactivation, de la thermoinactivation et de l'activité de substances virucides (Gerba et Schaiberger 1975, Gerba 1984).

## 3.2. Processus de pertes

### 3.2.1. Mortalité des virus

Un grand nombre de données concernant les taux de mortalité ou les pertes d'infectiosité des virus en milieux aquatiques proviennent de recherches sur les problèmes sanitaires liés à la contamination des eaux de boisson, de baignade ou des zones de productions conchylicoles par des entérovirus. Plusieurs travaux ont permis de montrer qu'il n'y avait pas de relation directe entre perte d'infectiosité et disparition du virion (Heldal et Bratbak 1991, Mathias et al. 1995, Garza et Suttle 1998, Wilhelm et al. 1998a). En

conséquence, les comptages viraux directs ne permettent pas d'estimer les abondances en virus infectieux.

Une étude menée en milieu lacustre a mis en évidence des taux de destruction de la capsidie identique et des taux d'inactivation différents pour deux virus appartenant à deux genres différents (Herrmann et al. 1974). Ceci suggère l'existence d'une « date de péremption » identique pour les capsides virales. Toutefois, les virus supérieurs à 60 nm semblent plus réfractaires à la destruction que les petites particules (Heldal et Bratbak 1991, Mathias et al. 1995).

Les radiations de forte énergie comme les UV-C ou les rayons X sont utilisées de manière courante en milieu hospitalier et sanitaire pour détruire ou inactiver les virus. En écologie virale, l'étude des effets des radiations solaires sur les communautés virales commence à être relativement bien documentée (Suttle et Chen 1992, Fuhrman et Suttle 1993, Suttle et Chan 1994, Wommack et al. 1996, Noble et Fuhrman 1997, Weinbauer et al. 1997, Garza et Suttle 1998, Wilhelm et al. 1998a, Wilhelm et al. 1998b). Les radiations solaires seraient le principal facteur de perte d'infectiosité dans les eaux de surface du Golfe du Mexique (Suttle et Chen 1992). Au sein de ces radiations, les UV-B auraient l'impact le plus délétère sur les particules virales (Suttle et Chen 1992, Noble et Fuhrman 1997, Wilhelm et al. 1998a) alors que celui des UV-A peut être négatif (Suttle et Chen 1992, Garza et Suttle 1995, Noble et Fuhrman 1997) ou positif (mécanisme de réparation de l'ADN). Les conséquences écologiques de la sensibilité des virus aux radiations solaires pourraient se traduire par des abondances plus faibles en virus infectieux dans les eaux de surface. Pourtant, des abondances de  $10^4$  à  $10^5$  cyanophages infectieux par ml ont été retrouvées dans les eaux de surfaces (Suttle et Chan 1993, Waterbury et Valois 1993, Suttle et Chan 1994). Le maintien d'une telle quantité de virus infectieux peut s'expliquer par l'existence d'un équilibre entre les dommages dus aux UV et la capacité des virus à réparer ces dommages grâce aux mécanismes de réparation de l'ADN de leurs cellules hôtes et leur propres mécanismes de réparation (photoréactivation et système de réparation SOS, Wommack et Colwell 2000).

L'élimination des bactéries d'un échantillon par filtration 0.2  $\mu\text{m}$  entraîne une diminution de 20 % du taux d'inactivation (dans l'obscurité) par rapport à un échantillon non traité (Noble et Fuhrman 1997). Dans la même étude, un effet virucide est observé lors de l'addition de matière organique de haut poids moléculaire (0.2  $\mu\text{m}$  - 30000 Da) concentrée par ultrafiltration. De plus, l'autoclavage d'eau naturelle avant l'addition de virus supprime l'effet



virucide dans des incubations à l'obscurité (Wiggins et Alexander 1985, Noble et Fuhrman 1997). La nature exacte des substances thermo-labiles à activité virucide présentes dans les eaux naturelles n'est pas connue mais leur activité s'apparente fortement à celle de protéases ou de nucléases.

La prédation par les flagellés constitue un autre facteur de mortalité non négligeable ( $\approx 2.5$  particules cellules<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, Gonzalez et Suttle 1993) pour les particules virales de grandes tailles (> 80 nm, Murray 1995).

### 3.2.2. Défenses anti-virus et résistance des bactéries

Quatre mécanismes de défenses bactériens contre l'infection virale ont été identifiés : inhibition de l'adsorption, blocage de l'injection de l'ADN phagique, modification des sites de restriction du génome bactérien, infection abortive (Weinbauer 2004)..

La couche de surface protéique (couche S) et les exo-polysaccharides (EPS) cellulaires constituent deux structures bactériennes impliquées dans l'inhibition de l'adsorption virale (Cowen 1992, Heissenberger et al. 1996a, 1996b, Stoderegger et Herndl 1998). Mais les EPS et la Couche S peuvent servir aussi de récepteurs et de sites d'attachement dans certains cas. De plus les bactériophages, grâce à des enzymes contenues dans la queue ou la capsid, sont capables de traverser ces barrières par dépolymérisation ou digestion enzymatique de celle-ci.

La documentation sur les mécanismes permettant de bloquer la pénétration du génome phagique est rare. Ces mécanismes seraient liés à des changements de la perméabilité membranaire (résistance accrue aux lysines virales) et dépendant de la température (rôle dans la fluidité de la membrane, Forde et Fitzgerald 1999).

Le troisième mécanisme de défense bactérien consiste dans des systèmes de restriction – modification : la méthylation de cytosines situées au niveau des sites de restriction du génome bactérien le protège de l'action de ses propres endonucléases de restriction. Celles-ci reconnaissent cependant dans l'ADN viral les sites de restrictions qui ne sont pas méthylés et hydrolysent le génome viral. Mais les virus ont su évoluer et ont développé à leur tour des stratégies de défenses comme la suppression des sites de restrictions, la modification de leur bases, la synthèse de protéines inhibitrices des endonucléases et l'acquisition de gènes codant pour des méthylases.

L'infection abortive se met en place après la pénétration du génome viral et constitue en fait un suicide de la cellule empêchant la prolifération du virus au sein de la population.

Lors d'expériences sur des cultures pures, il a été démontré que les bactéries étaient capables de développer rapidement des mécanismes de résistances vis à vis d'infections virales (Lenski 1988). Or, dans les écosystèmes aquatiques, les titres viraux se maintiennent à des niveaux relativement élevés. Les mécanismes de résistances bactériens sont basés sur une réduction de l'expression ou sur une expression ponctuelle (Suttle 2000) des récepteurs permettant l'attachement des virus. Ces récepteurs pouvant être des molécules permettant l'assimilation des nutriments, le coût physiologique lié à la résistance aux virus pourrait expliquer le maintien des titres viraux, spécialement dans les milieux oligotrophes (e. g. pauvres en nutriment, (Levin et al. 1977)). Les résultats montrant une réduction du taux de croissance de bactéries résistantes par rapport à des bactéries sensibles semblent confirmer cette hypothèse (Levin et al. 1977, Lenski 1988, Middelboe 2000). Un équilibre s'établirait entre la nécessité de développer des récepteurs permettant l'assimilation des nutriments et la nécessité de diminuer la probabilité d'infection virale. En milieu oligotrophe, certaines bactéries seraient capables de modifier leurs récepteurs pour attirer des virus incompatibles afin d'utiliser leur ADN comme source de nutriments tout en n'étant plus permissives. Récemment, en utilisant des systèmes bactériophages-hôtes, il a été démontré que les bactériophages n'avaient qu'un effet temporaire sur les populations bactériennes jusqu'à ce que celles-ci acquièrent une forme de résistance (Middelboe et al. 2001). En utilisant ces données dans un modèle faisant intervenir une pression de grazing, Middelboe et al. (2001) ont observé un retour de la sensibilité bactérienne permettant ainsi de maintenir la production virale.

## 4. Infection virale et conséquences environnementales

### 4.1. Implication dans les cycles biogéochimiques

Les organismes stockant leur énergie sous forme de liaisons carbonées, les flux de carbone organique sont généralement utilisés par les écologues comme traceur des flux énergétiques dans les réseaux trophiques. La vision de la circulation du carbone au sein des

---

réseaux trophiques a considérablement changée depuis la découverte de l'incroyable abondance des organismes procaryotes dans les écosystèmes aquatiques. Depuis maintenant une trentaine d'année, l'importance des processus microbiens et le rôle central joué par le bactérioplancton au sein des réseaux trophiques aquatiques est reconnue (Pomeroy 1974). Les bactéries hétérotrophes représenteraient de 40 à 70 % du carbone vivant dans les eaux de surface océaniques (Fuhrman et al. 1989, Tableau 4.1). Et l'ensemble des cellules procaryotes (hétérotrophes et phototrophes) représenterait 90 % du carbone « vivant » dans les océans (Wilhelm et Suttle 1999).

La production secondaire de carbone par le compartiment bactérien peut parfois dépasser la production primaire réalisée par les organismes photosynthétiques (Sorokin 1971). Ceci est pris en compte dans le concept de la boucle microbienne (Pomeroy 1974, Azam et al. 1983), dans laquelle les bactéries hétérotrophes transforment le carbone provenant de la photosynthèse et piégé dans la MOD, en biomasse carbonée utilisable par les étages supérieurs (microzooplancton) du réseau trophique (Figure 4.1). Cette boucle permet en outre de recycler certains composés organiques dissous en nutriments régénérés disponibles pour le phytoplancton. 10 à 50 % des flux de nutriments et de carbone des réseaux trophiques marins transiteraient à travers cette boucle microbienne sous forme de matière organique dissoute (MOD, Fuhrman 1999).

Les lyses virales entraînent la libération dans le milieu de virions, mais aussi de fragments cellulaires et de macromolécules. Ces débris cellulaires, qui se présentent sous la forme de molécules non sédimentables (dissoutes ou colloïdales), viennent enrichir le pool de MOD, et sont assimilables par les bactéries hétérotrophes (Bratbak et al. 1990, Proctor et Fuhrman 1990, Fuhrman 1992). Par cette activité lytique, les virus détournent les flux de carbone et de nutriments des consommateurs secondaires, ce qui constitue un shunt viral (Figure 4.1) par lequel passeraient de 6 à 26 % du carbone organique produit par photosynthèse (Wilhelm et Suttle 1999).

Parce que le carbone n'est pas le seul constituant des êtres vivants, les virus agissent également sur les cycles biogéochimiques des autres éléments constituant la matière organique (Wilhelm et Suttle 1999, Wommack et Colwell 2000). Ils interviennent notamment dans le recyclage de nutriments intervenant dans la limitation de la production primaire tels l'azote et le phosphore (Proctor et Fuhrman 1991, Fuhrman et Suttle 1993, Thingstad et al. 1993, Bratbak et al. 1994) ou le fer (Gobler et al. 1997).

Tableau 4.1 : Estimation des stocks de carbone dans l'océan (d'après Wilhelm et Suttle 1999).  
<sup>a</sup>D'après Hinga (1979), en assumant une distribution homogène dans les deux hémisphères.  
<sup>b</sup>En assumant 20 fg par cellule et  $1 - 5 \times 10^8$  cellules  $l^{-1}$ . <sup>c</sup>En assumant 0.2 fg de carbone par virus et  $10^9$  à  $10^{10}$  particules  $l^{-1}$ .

SOURCE	MASSE DE CARBONE
Baleine <sup>a</sup>	4.1 Mt
Bactéries <sup>b</sup>	2740 – 13700 Mt
Virus <sup>c</sup>	27 – 270 Mt

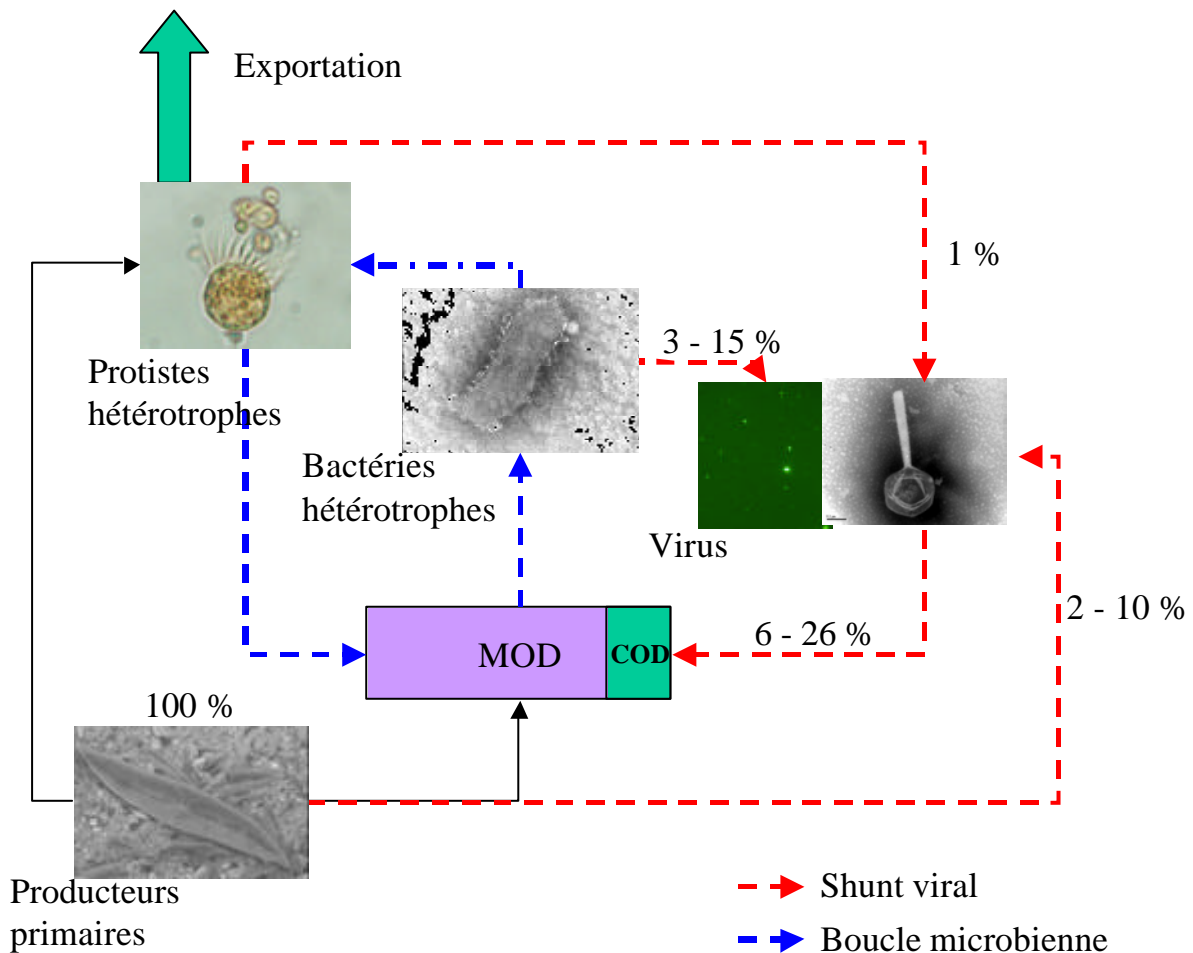


Figure 4.1 : Schéma de la boucle microbienne et du shunt viral d'après Fuhrman (1999) et Wilhelm et Suttle (1999). La lyse virale des microorganismes libère dans le milieu des virions et de la MOD ce qui constitue un shunt de la boucle microbienne.

---

## 4.2. Impact des virus sur le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques

La modification des cycles biogéochimiques suite aux lyses virales est la preuve irréfutable de l'influence du virioplancton sur les processus microbiens (production bactérienne, production primaire...) à la base des réseaux trophiques aquatiques. En diminuant la biomasse disponible pour les étages supérieurs du réseau trophique, les lyses virales entraîneraient une diminution de la respiration et de la production du zooplancton (Fuhrman et Suttle 1993, Fuhrman 1999, Weinbauer 2004). Simultanément, la conversion de la biomasse en MOD disponible pour les procaryotes, permettrait une augmentation de l'activité bactérienne (respiration et production) et donc une plus forte reminéralisation des nutriments. L'enrichissement ou la suppression expérimentale des virus d'eaux naturelles a permis de mettre en évidence des changements dans :

- Les abondances bactériennes (Peduzzi et Weinbauer 1993b, Hennes et Simon 1995, Weinbauer et Peduzzi 1995, Noble et Fuhrman 1999)

- Les activités enzymatiques (Noble et Fuhrman 1999),

- La production et respiration bactérienne (Pesan et al. 1994, Middelboe et Lyck 2002)

- La concentration et la composition de la MOD et de la MOP (Peduzzi et Weinbauer 1993a, 1993b, Weinbauer et Peduzzi 1995)

- La dynamique des flagellés (Peduzzi et Weinbauer 1993b, Pesan et al. 1994)

- Les concentrations en chl *a*, la production primaire et la respiration du phytoplancton (Suttle et al. 1990, Suttle 1992, Peduzzi et Weinbauer 1993a, Hewson et al. 2001a, Hewson et al. 2001b, Eissler et Quinones 2003, Eissler et al. 2003).

Avec les protistes (flagellés et ciliés), les virus sont les principaux prédateurs des bactéries dans les écosystèmes aquatiques. La prédominance des lyses virales ou du grazing comme première cause de mortalité bactérienne varie fortement dans le temps et l'espace. La mortalité bactérienne due aux lyses virales est notamment plus importante dans les milieux extrêmes comme les systèmes anoxiques (Weinbauer et Höfle 1998), hyper-salés (Guixa-Boixareu et al. 1996) ou très froids (Guixa-Boixereu et al. 2002). Dans son modèle, Fuhrman (1999) montre qu'en considérant une mortalité bactérienne équivalente entre flagellés

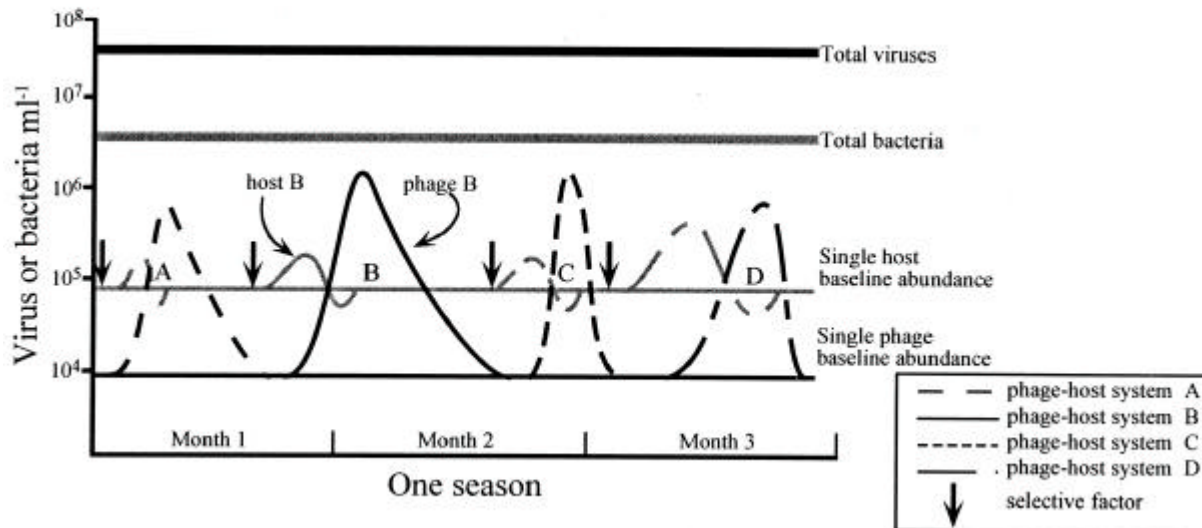


Figure 4.2: Modèle conceptuel représentant la régulation de la diversité des communautés hôtes par le virioplancton (source Wommack et al. 1999b). Pour chaque système hôte phage, un facteur environnemental déclenche la croissance de la population hôte. A partir d'une densité critique en cellules hôtes, l'infection virale s'accroît provoquant une augmentation du titre viral et la diminution de l'abondance de la population hôte jusqu'à un niveau de base. Cette dynamique prévient la dominance d'une seule population hôte. Après déclin de l'abondance de la population hôte, l'abondance de la population virale diminue jusqu'à son propre niveau de base. Alors que les abondances des populations hôtes et virales oscillent rapidement dans le temps, l'abondance des deux communautés (virioplancton et bactérioplancton) reste stable sur de longues échelles de temps (e. g. saison). A et D, correspondent à des systèmes hôte phage ayant un *burst size* moyen de 10 à 50; B et C à des systèmes hôte phage ayant un *burst size* élevé de 100 à 500; A et B ont des taux de déclin viraux faibles; C et D, des taux de déclin viraux élevés.

et virus, l'addition des virus au modèle entraîne une augmentation de la respiration et de la production bactérienne de 27 % alors que la pression de grazing et la production du zooplancton sont diminuées de 37 et 7 % respectivement.

### 4.3. Contrôle de l'abondance et maintien de la diversité des cellules hôtes

La présence d'une forte abondance virale dans les milieux aquatiques témoigne d'une production importante et donc de la lyse d'un grand nombre de microorganismes. Par leur activité lytique, ils agissent directement sur le contrôle des populations planctoniques (Fuhrman et Noble 1995), à la fois en terme d'abondance mais aussi en terme de diversité. Cette activité (lyse virale) des virus, leur confère le statut de niveau égal à celui des prédateurs phagotrophes tels que les protistes (grazing) (Bratback et al. 1995, Garza et Suttle 1995, Weinbauer et Höfle 1998). De par leur grande abondance, les populations bactériennes sont les plus sujettes aux infections virales : 20 à 50 % de la mortalité quotidienne du bactérioplancton en milieu eutrophe et 10 % à 20 % de cette mortalité en milieu oligotrophe (Steward et al. 1996, Fuhrman 1999, Wilhelm et Suttle 1999) seraient dus aux lyses virales. En participant au contrôle de la dynamique des populations bactériennes, les virus agissent sur la dynamique de la boucle microbienne. Mais les virus n'agissent pas seulement sur les populations bactériennes, ils sont aussi responsables de 10 % de la mortalité quotidienne des cyanobactéries (Fuhrman et Suttle 1993, Suttle et Chan 1994) et d'un faible pourcentage (1 %) de la mortalité quotidienne du phytoplancton eucaryote (Suttle 1994, Cottrel et Suttle 1995, Suttle 1999b).

Le maintien de l'abondance et de la diversité des populations hôtes par les virus est expliquée par un concept nommé «killing the winner » (Fuhrman et Suttle 1993). Dans ce concept, les virus réguleraient préférentiellement les populations dominantes (Thingstad et Lignell 1997, Thingstad 2000). Ceci permettrait d'établir un équilibre dans lequel les populations moins compétitives pourraient se maintenir. Ce concept suppose donc une oscillation dans le temps des populations virales et hôtes à l'instar d'un modèle proie-prédateur classique (Figure 4.2). Ce genre d'oscillations a déjà été reporté à la fois en terme d'abondance pour des cultures en chemostat (Lenski 1988) mais aussi en terme de diversité (Wommack et al. 1999a, Wommack et al. 1999b, Steward et al. 2000, Fuhrman et al. 2002, Riemann et Middelboe 2002). La conclusion du bloom artificiel d'une population algale par

sa population virale semble aussi confirmer cette théorie (Hennes et al. 1995). Un modèle créé par Wommack et al. (1999b) basée sur des interactions proie-prédateur, montre que pendant qu'une population virale et sa population hôte oscillent, les abondances totales des communautés virales et hôtes restent quant à elles constantes. Ceci illustre parfaitement les dynamiques observées, de l'échelle du jour à la saison, pour des systèmes considérés comme stables. L'addition de concentrats viraux à des communautés naturelles a permis de mettre en évidence des changements dans la composition des producteurs primaires (Suttle 1992). D'autres expériences ont montré que la composition de communautés bactériennes différait en l'absence ou en présence de virus (Weinbauer 2004). Ces résultats confirment l'influence des lyses virales sur la diversité. La création de micro-niches, due à la libération de MOD, autour des zones de lyses pourrait favoriser le développement de populations spécifiques modifiant ainsi la composition des cellules hôtes (Middelboe 2000).

#### 4.4. Transfert de matériel génétique

L'échange de matériel génétique chez les procaryotes peut se faire de trois manières différentes : la transformation, la conjugaison et la transduction (échange de matériel génétique par l'intermédiaire d'un bactériophage). La présomption d'un spectre d'hôtes potentiels restreint pour les bactériophages a conduit à la prévalence supposée de la transformation et de la conjugaison comme mécanismes d'échanges de matériel génétique. Les récents résultats rapportant des taux de transductions élevés en milieu marin (Chiura 1997) ainsi que des spectres d'hôtes potentiels dépassant le niveau du genre (Chiura et Tagaki 1994, Chiura 1997) semblent prouver le contraire. Par rapport à la transformation et la conjugaison, la transduction offre différents avantages comme une protection efficace du matériel génétique à l'intérieur du virus, une dissémination importante et l'indépendance vis à vis du taux de contact entre cellules comme cela est nécessaire dans la conjugaison.

Il existe deux types de transduction, la transduction généralisée et la transduction spécifique. Dans la transduction généralisée, une partie du génome de la cellule hôte, quelle que soit sa localisation, se retrouve incluse dans les capsides virales lors de la morphogénèse des particules virales (Saye et al. 1990). Il en résulte des virus défectifs (non fonctionnels) capables d'infecter une cellule hôte et d'insérer leurs matériels génétiques mais incapable de produire de nouveaux virions (Kokjohn 1989). Ce mode de transduction concerne les virus lysogènes autant que les virus à cycle lytique. La transduction spécialisée ne concerne que les



virus lysogènes et seuls certains gènes placés près de la zone d'insertion du provirus seront inclus dans les nouveaux virions après induction du cycle lytique.

L'échange de gènes par transduction peut entraîner une modification des capacités métaboliques, des modifications morphologiques, la capacité de produire des toxines et l'acquisition de systèmes de résistances. En revanche, l'utilité de la transduction dans le maintien de phénotypes bactériens désavantageux (e. g. biodiversité) reste en suspens.

Les conséquences écologiques de la libération d'ADN dissous dans le milieu et les taux de transformations restent encore à être évalués (Weinbauer 2004).

## PARTIE 2 :

### MATERIELS ET METHODES

# 1. Le site d'étude

## 1.1. Le bassin de Marennes Oléron

Le bassin estuarien de Marennes Oléron est délimité au nord par l'île d'Aix, à l'ouest par l'île d'Oléron et enfin par le littoral de la Charente Maritime au sud et à l'est. Il est protégé des effets de la houle par les îles d'Oléron et de Ré respectivement à l'ouest et au nord-ouest (Figure 1.1).

Ce bassin estuarien d'une profondeur moyenne de 5 m présente une superficie de 150 km<sup>2</sup> à la côte NGF + 5 (Pouliquen 1975). Les deux tiers découvrent par marée de vives eaux, laissant apparaître des vasières intertidales dont 2541 ha sont occupés par des parcs ostréicoles et 100 km par des bouchots pour la mytiliculture (Monographie des Affaires Maritimes 1997). Le bassin de Marennes Oléron constitue le centre conchylicole le plus important d'Europe avec un stock ostréicole de 95000 tonnes pour une production annuelle de 40000 à 50000 tonnes d'huîtres (données affaires maritimes), et le deuxième site de captage de naissain au niveau national.

Le bassin s'ouvre sur l'océan par le pertuis d'Antioche au nord et par l'étroit pertuis de Maumusson (1 km de large) au sud. Selon le coefficient de la marée et les débits fluviaux, le volume d'eau contenu dans le bassin varie de 500 à 110000 millions de m<sup>3</sup>, et le temps de résidence de 4 à 10 jours (Laboratoire central hydraulique de France, LCHF 1973). Les phénomènes hydrodynamiques se déroulant au niveau du bassin ont été étudiés successivement par Tesson (1973), Klingebiel et al. (1971), Klingebiel et Tesson (1974) et finalement par le LCHF (1973) qui a modélisé ces phénomènes, mettant en évidence une circulation nord-sud des eaux du bassin entraînant les eaux provenant de la Charente par le coureau d'Oléron.

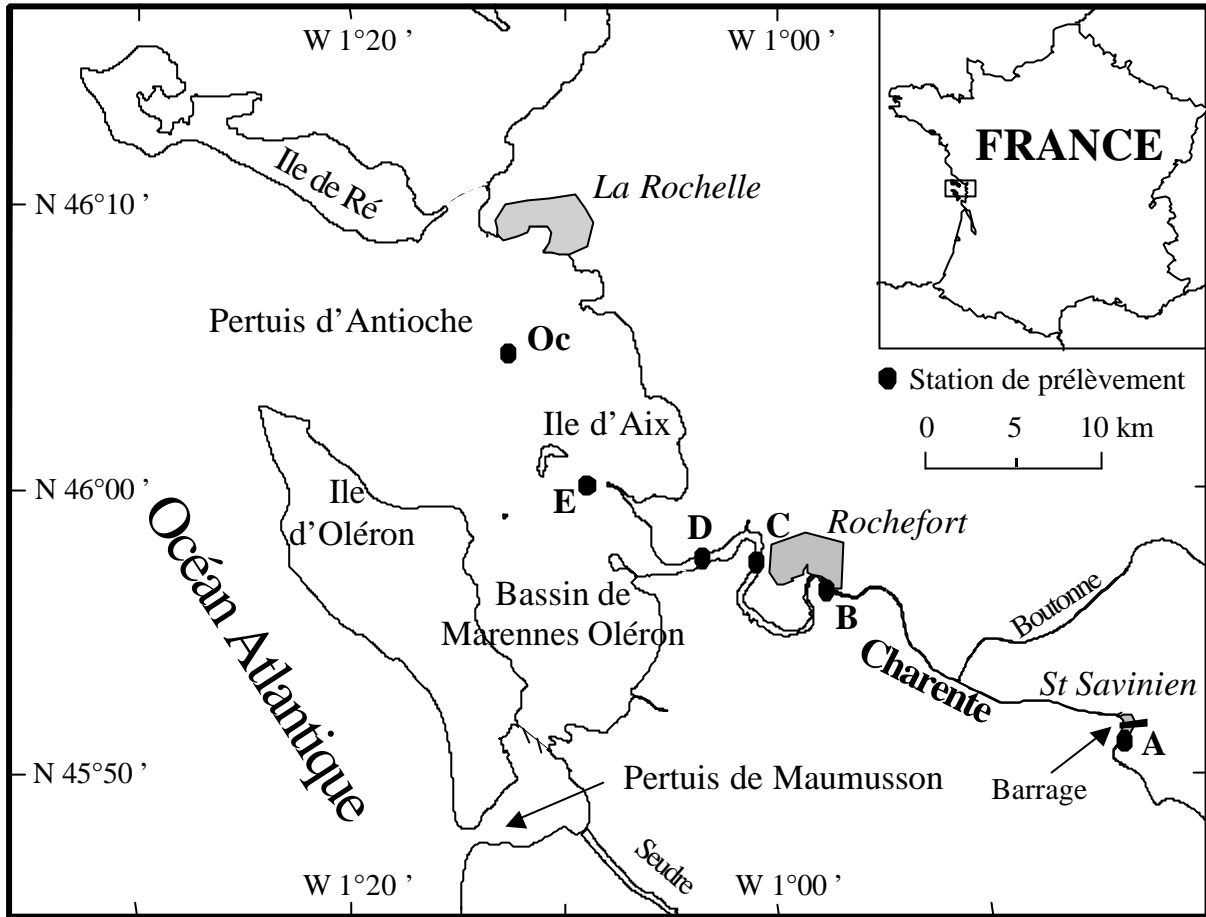


Figure 1.1 : Situation géographique du bassin de Marennes Oléron et de l'estuaire de la Charente (source Pierre Richard) et position des stations de prélèvements.

Dechambenoy et al. (1977) par thermographie infra-rouge, Nichols (1974) et Fralit et al. (1981), par télédétection satellitaire, ont confirmé cette circulation des eaux dans le bassin de Marennes Oléron. En outre, la configuration du bassin favorise le clapot (Verger 1968) qui, associé aux courants et à une grande amplitude de marée (6 m), entraîne une turbidité importante ainsi qu'un mélange efficace des eaux du bassin (Riera 1995).

## 1.2. La Charente

Les apports d'eau douce au niveau du bassin sont assurés par la Charente (débit moyen de  $100 \text{ m}^3/\text{s}$ ), par la Seudre (débit moyen de  $10 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ), par la Gironde (débit moyen de  $900 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) et dans une moindre mesure par des ruisseaux collecteurs des marais qui bordent le rivage (Allen et al. 1974). En période d'étiage, les  $9 / 10^{\text{ème}}$  de ces apports d'eau douce au niveau du bassin sont assurés par la Charente alors que son débit n'est plus que de  $12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Ravail-Legendre 1993). En période de crues hivernales, la Charente peut être supplantée par la Gironde dont les eaux pénètrent dans le bassin principalement par le pertuis d'Antioche, après avoir contourné l'île d'Oléron par la côte ouest, et dans une moindre mesure par le pertuis de Maumusson. Néanmoins, toutes les études hydrobiologiques concernant le bassin (Verger 1968, Carruesco 1971, Gras et al. 1971, Barusseau 1973, Leborgne et al. 1973, Pouliquen 1975, Berthome et al. 1978, Héral et al. 1989, Riera 1995) mettent en évidence le rôle majeur joué par la Charente dans les apports d'origine continentale vers les zones ostréicoles du bassin.

La Charente est un fleuve côtier long de 350 km drainant un bassin versant de 10000 km<sup>2</sup> et débouchant dans le bassin de Marennes Oléron au niveau de Fouras (Figure 1.2). Son estuaire, large de 3 km à son embouchure, présente de nombreuses slikkes latérales découvertes à marée basse (Tesson 1973). La dénivellation très faible du fleuve dans sa partie inférieure entraîne la formation de nombreux méandres (Tesson 1973 ; Agence de l'eau Adour Garonne 1990). Son bassin versant, à dominante rurale, présente une agriculture très diversifiée (Agence de l'eau Adour Garonne 1990).

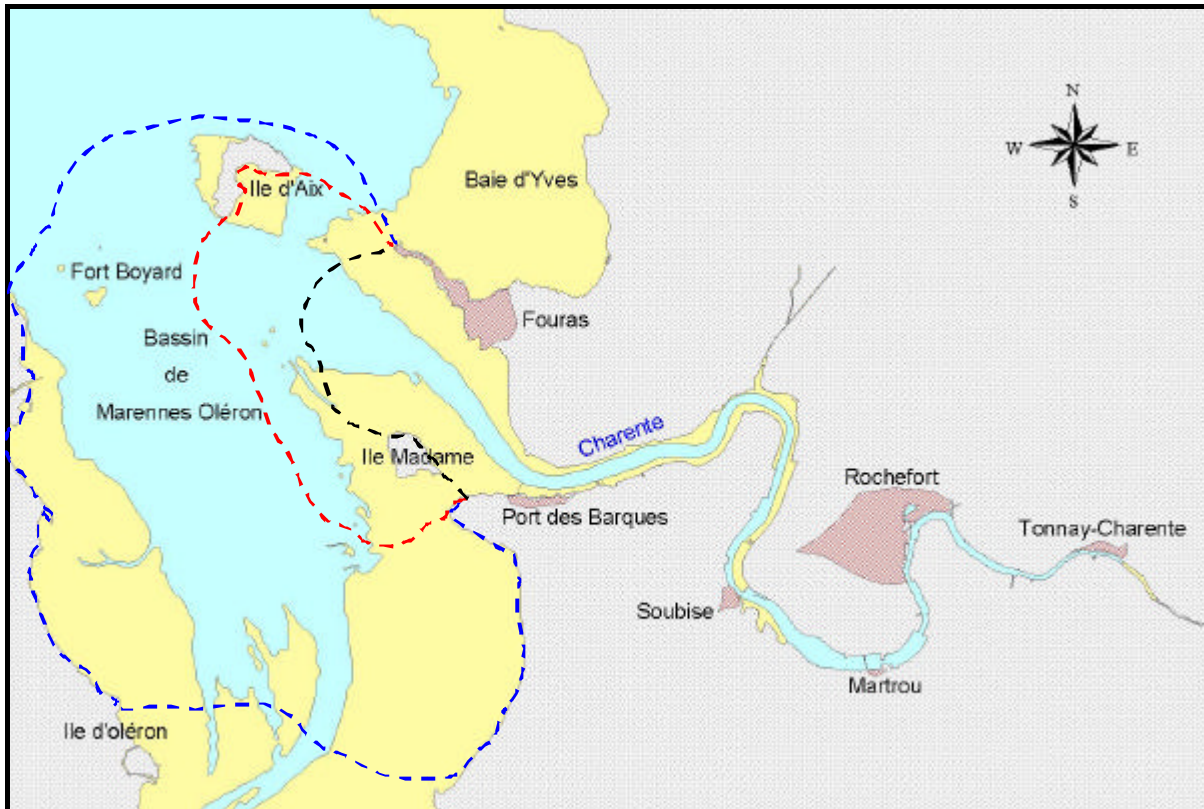


Figure 1.2 : Carte représentant l'estuaire de la Charente (source IFREMER). Les estrans sont représentés en jaune et les villes sont hachurées en rouge. Les lignes en pointillées délimitent les aires d'influence des eaux de la Charente sur le bassin de Marennes Oléron en période d'été automnal (noir), d'été estival (rouge) et de crues (bleue).

Les phénomènes hydrauliques régissant le fonctionnement de l'estuaire à proprement parler sont moins documentés que ceux concernant le bassin. Bœuf (1949) puis Genesseeux (1958) ont décrit l'affrontement des eaux marines et des eaux douces au niveau de l'estuaire interne. Phénomènes précisés par Salvador (1976) par l'intermédiaire de quatre missions saisonnières dans l'estuaire interne. Plus récemment, l'étude réalisée par Ravail-Legrand (1993) sur l'influence du débit de la Charente sur la capacité biotique du bassin de Marennes Oléron a permis d'identifier les aires d'influence du fleuve sur le bassin quels que soient le débit et la marée (Figure 1.2).

Pour leur part, Raillard et Menesguen (1991) ont démontré que la réduction du débit fluvial associée à une diminution des apports en nitrates durant les périodes d'étiage, entraîne une réduction de la productivité primaire au niveau des aires conchylicoles de Marennes Oléron.

### 1.3. Dynamique des paramètres hydrologiques de la Charente

#### 1.3.1. Les débits

Ceux-ci sont très variables en fonction de la période de l'année. D'une manière générale, la période s'étendant de décembre à avril est caractérisée par de fortes crues durant lesquelles le débit peut atteindre des valeurs de  $470 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Riera 1995, Tesson 1973). En période estivale, le débit d'étiage diminue jusqu'à des valeurs de  $5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ .

En estimant le débit total moyen de la Charente à  $100 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ , Tesson a pu calculer que le volume d'eau douce annuel apporté par la Charente au Bassin de Marennes Oléron est égal à 3,16 milliards de  $\text{m}^3$ .

#### 1.3.2. Marée dynamique

C'est en période hivernale durant les basses mers de vives eaux que la pénétration de la marée dans l'estuaire est la plus faible. C'est donc lors de ces événements que les eaux de la Charente gagnent le plus facilement la baie de Marennes Oléron.

La limite de la pénétration de la marée dynamique dans l'estuaire se situe à 82 km de l'embouchure (Genesseeux 1956). Cette limite a été modifiée par la construction d'un barrage au niveau de Saint-Savinien. Toutefois, lors de forts coefficients de marée, le barrage est ouvert pour éviter l'inondation des zones en aval de Saint-Savinien. La pénétration de la marée dans l'estuaire se fait avec un retard qui dépend du coefficient et du débit fluvial. La

déformation des courbes de marée entraîne une très longue tenue des pleines mers (3 h) en particulier dans le cas des mortes eaux.

### 1.3.3. Marée saline

En ce qui concerne la limite de pénétration de la marée saline, elle se situe au niveau de Tonnay-Charente en période d'étiage et au niveau de Martrou en période de crues (Figure 1.2). La pénétration de cette marée saline provoque la formation d'un bouchon vaseux au niveau du front de salinité. Ce bouchon vaseux se déplace entre Rochefort et Port des Barques en fonction du débit fluvial et des marées, et peut, lors de crues suffisamment importantes, être évacué dans le bassin.

L'évacuation des eaux fluviales qui ne sont pas vraiment douces, se fait tout d'abord par la rive droite de l'embouchure, le long de Fouras puis par la côte sud est de l'île d'Aix (Tesson 1973, Genesseeux 1956).

## 2. Stratégie d'échantillonnage

### 2.1. Choix des stations de prélèvement

La zone d'échantillonnage s'étend de Saint-Savinien au sud-est de l'île d'Aix (Figure 1.1) et comporte cinq stations de prélèvements. Chaque station étant caractérisée par une classe de salinité, leur position géographique oscille donc en fonction du débit de la Charente et du coefficient de marée. Les prélèvements ont été réalisés à partir du chaland «Estran» de l'Université de La Rochelle.



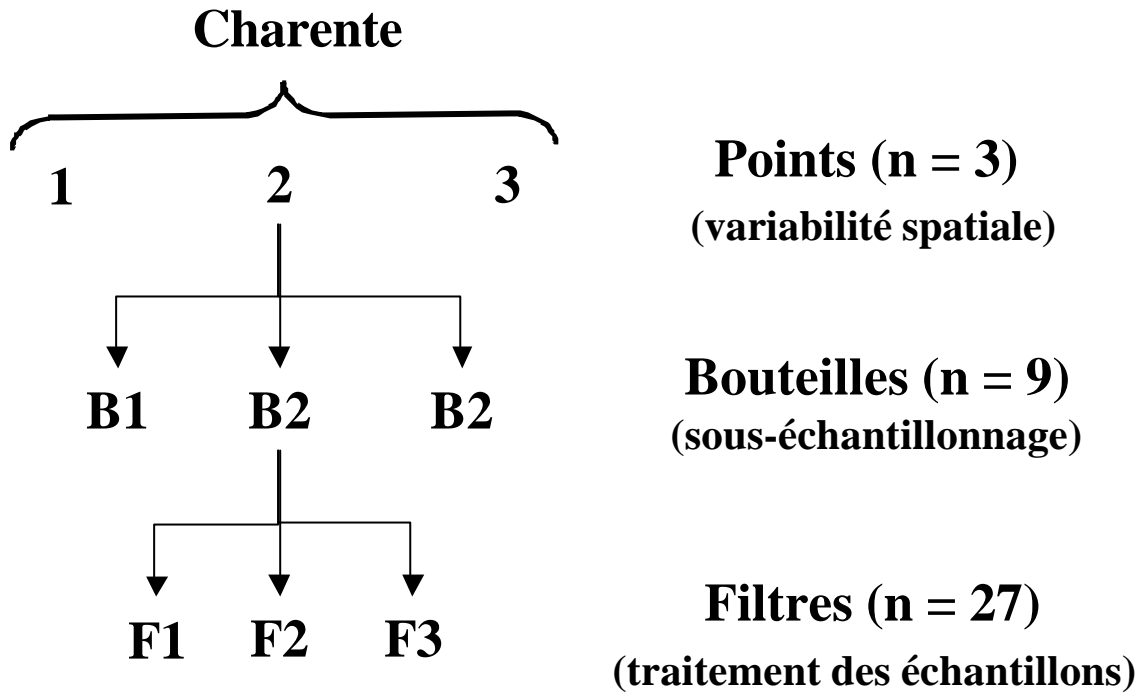


Figure 2.1 : Plan d'expérience du pré-échantillonnage

Tableau 2.1 : Coefficient de variation (CV) calculés pour le site (CV site), le sous échantillonnage (CV ss ech) et les traitements (CV trait).

Point	Bouteille	CV	CV virus (%)	CV bactéries (%)
1	1.1	Trait	3.1	1.2
	1.2	Trait	1.8	6.2
	1.3	Trait	1.1	3.2
Ss ech			2.9	3.8
2	2.1	Trait	0.7	5.1
	2.2	Trait	2.1	1.7
	2.3	Trait	0.9	2.4
Ss ech			1.6	3.8
3	3.1	Trait	1.7	2.3
	3.2	Trait	1.0	1.8
	3.3	Trait	0.8	1.7
Ss ech			1.9	1.7
Site			2.3	3.0

Cette stratégie de prélèvements s'inscrit dans une volonté de comparer dans le temps, des eaux présentant des caractéristiques physico-chimiques proches. En effet, à l'intérieur de tout estuaire, la salinité est un paramètre conservatif dont dépendent de nombreuses réactions

physico-chimiques. Le choix des cinq classes de salinité caractérisant les cinq stations de prélèvements, s'est inspiré de la classification haline du Venice Symposium (Mc Lusky 1989) :

- Dans zone limnetique : classe de 0 à 0.5 PSU = station A
- Dans zone oligohaline : classe de 3 à 5 PSU = station B
- Dans zone mésohaline : classe de 13 à 17 PSU = station C
- Dans zone polyhaline : classe de 20 à 24 PSU = station D
- Dans zone euhaline : classe > 30 PSU = station E

Une station supplémentaire (station Oc) située dans le pertuis d'Antioche (> 33 PSU) a été suivie dans le cadre des mesures de la diversité virale. Cette station a constitué une sorte de contrôle puisque les eaux de la Charente ne l'atteignent pas.

Les classes de salinité correspondant aux zones polyhalines et euhalines sont des zones de l'estuaire et du bassin identifiées par Ravail-Legrand (1993) comme étant respectivement, une zone de mélange et d'affrontement eaux douces - eaux marines (station D) et une zone d'influence du fleuve sur le milieu marin (station E).

Concrètement, le positionnement pour chaque station s'est fait grâce à un thermo-salinomètre embarqué à bord (WTW de type LF196). Les prélèvements ont toujours eu lieu lors de marées de vives eaux (coefficients compris entre 80 et 100) à mi-marée du jusant, moments où l'influence du fleuve sur le bassin est la plus importante. Enfin, les prélèvements ont été réalisés en sub-surface (0 à 1 m de profondeur) à l'aide d'une bouteille de type Van Doorn (Wildco).

## 2.2. Validation de la stratégie d'échantillonnage

Afin de définir et de valider une stratégie d'échantillonnage, il était nécessaire de déterminer la variabilité des abondances virales et bactériennes liée à (i) la variabilité spatiale dans le milieu naturel, (ii) au sous échantillonnage et enfin (iii) aux différents traitements (dilutions, filtrations, colorations, comptage...). Pour cela, une campagne de pré-échantillonnage a été réalisée le 27/03/02 au niveau du barrage de Saint-Savinien (Figure 1.1). Durant cette campagne, trois points (1, 2 et 3) ont été échantillonnés dans la largeur du fleuve. Pour chaque point, trois réplicats de huit litres ont été prélevés dans des bouteilles NALGENE

opaques. Enfin, pour chaque bouteille opaque, trois membranes WHATMAN de type Anodisc (filtre 25 mm, 0.02  $\mu\text{m}$ ) ont été utilisées pour dénombrer les virus et les bactéries (Figure 2.1, voir le paragraphe 3.1.1 ci-dessous pour les détails de la méthode de dénombrement).

Les coefficients de variation (CV) des titres viraux et bactériens calculés pour le site (CV site), le sous échantillonnage (CV ss ech) et les traitements (CV trait) laissent deviner une faible variabilité des concentrations virales et bactériennes (Tableau 2.1). Les CV du site notamment ne dépassent pas 3 %, ce qui est confirmé par une absence de différence significative ( $p > 0.05$ ,  $n = 27$ , ANOVA hiérarchique) des abondances virales et bactériennes entre les points 1, 2 et 3. Dans le cas des virus, l'analyse des composantes de la variance montre que 78 % de cette variance sont dus au sous échantillonnage (40 %) et aux traitements des échantillons (38 %). Pour les bactéries, 70 % de la variance se situe au niveau du traitement des échantillons.

L'analyse statistique des abondances virales et bactériennes par une ANOVA hiérarchique et les calculs des CV mettent en évidence une variabilité exceptionnellement faible des abondances microbiennes dans la largeur de la Charente. Cette variabilité est tellement faible qu'elle met en valeur la variabilité due au sous échantillonnage et aux traitements des échantillons. Cependant, il ne faut pas en conclure que les méthodes d'échantillonnage et de traitement sont inadaptées. En effet, même dans le cas des virus où le sous échantillonnage compte pour 40 % de la variance, cela ne représente au final qu'une variation de 1% (composante de la variance liée au sous échantillonnage  $\times$  CV site) du titre viral.

D'après les résultats obtenus, il a été décidé de réduire l'effort d'échantillonnage à deux points de prélèvements par station de salinité. Cependant, pour tenir compte de la variabilité due au sous échantillonnage et aux traitements des échantillons, trois bouteilles Van Doorn ont été prélevées par point ( $3 \times 2$  l) puis mélangées dans une bouteille Nalgene opaque de 8 l. Ensuite, trois filtres Whatman de type Anodisc (25 mm, 0.02  $\mu\text{m}$ ) ont été réalisés sur un sous échantillon (5 ml) de chaque bouteille opaque pour dénombrer les virus et les bactéries. Les activités bactériennes ainsi que les paramètres environnementaux n'ont été mesurés que sur une seule bouteille opaque par point.

Les échantillons, qu'ils soient filtrés ou non sur le navire, ont été conservés à 4°C jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été traités dans les trois heures suivant le

prélèvement. Les échantillons destinés à la mesure des activités bactériennes ont été conservés à la température *in situ* et les activités ont été mesurées dès le retour au laboratoire (délai < 3 – 4 h). Toutes les analyses ont été réalisées dans les cinq jours suivant la date du prélèvement excepté pour le dosage des sels nutritifs et du COD dont les échantillons ont été conservés à – 20°C jusqu'à leur analyse.

## 3. Mesure des paramètres microbiologiques

### 3.1. Abondance microbienne

#### 3.1.1. Microscopie en épifluorescence

Un échantillon (5 ml) par bouteille de 8 l a été fixé immédiatement à bord du bateau avec du formol (concentration finale de 2 %) filtré 0.2 µm, puis conservé à 4°C jusqu'au laboratoire. Les abondances virales et bactériennes ont été déterminées par microscopie en épifluorescence en utilisant le SYBR green I (Molecular probes, Inc.) comme colorant des acides nucléiques (Noble et Fuhrman 1998). Deux ml d'échantillon dilué 100 fois sont filtrés sur membrane Whatman de type Anodisc (25 mm, 0.02 µm) suivi d'un filtre Millipore en nitrocellulose (0.2 µm, type GS) permettant une répartition homogène des particules virales et bactériennes sur la membrane Anodisc. Ces membranes sont ensuite colorées pendant 30 min à l'obscurité avec du SYBR green I dilué au 1 :10000 (eau milliQ filtrée 0.2 µm, Millipore Corp.). Afin de vérifier l'absence de virus dans l'eau de dilution, des contrôles ne contenant que de l'eau MilliQ filtrée 0.2 µm ont été traités en parallèle des échantillons. Après 30 min de marquage, l'excédent de fluorochrome retenu sur les membranes est enlevé en appliquant le dos des membranes contre du papier filtre. Enfin, les membranes sont montées entre lame et lamelle avec addition, sur chaque face de la membrane, de 12.5 µl d'anti-fading (0.5 % acide ascorbique in 50 % glycérol / 50 % PBS [0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.85 % NaCl, pH 7.5]).

Les lames ont été conservées à –20°C jusqu'au moment des comptages, effectués dans les cinq jours après la date du prélèvement. Les virus et bactéries ont été dénombrés à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence (Leica) sous une longueur d'onde d'excitation située dans le bleu. Pour chaque station, six lames (3 par sous échantillon de 5 ml) ont été

réalisées et au moins 150 bactéries et 200 virus ont été comptés par membrane sur des champs choisis aléatoirement. Virus et bactéries ont été différenciés sur la base de critères de taille et de fluorescence (les bactéries étant souvent plus larges et fluorescentes que les particules virales).

### 3.1.2. Mesure des abondances bactériennes par cytométrie de flux (CMF)

La mesure des abondances bactérienne par CMF a permis d'une part d'étalonner la méthode de comptages en épifluorescence, et d'autre part d'accéder à deux paramètres bactériens supplémentaires : le biovolume et les sous-populations à haute (HNA) et basse quantité d'ADN (LNA).

Le comptage en parallèle des abondances bactériennes par CMF et par épifluorescence sur quelques échantillons montre que les deux techniques donnent des résultats similaires ( $r = 0.94$ ,  $n = 39$ , Figure 3.1). Pour des raisons de bruit de fond trop important du aux fortes concentrations en MES, les abondances virales n'ont pu être dénombrées par cette méthode.

Pour les mesures en CMF, les échantillons (3 ml, duplicats) ont été immédiatement fixés avec du formol filtré  $0.2 \mu\text{m}$  (2 % concentration finale) et conservés dans des cryotubes à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au moment de leur analyse à l'observatoire océanologique de Banyuls. Les bactéries sont marquées par addition de 2.5 à 5  $\mu\text{l}$  d'une solution stock de SYBR green I (dilué au 1/10) dans 1 ml d'échantillon. Deux  $\mu\text{l}$  de billes autofluorescentes (1  $\mu\text{m}$ , Polyscience Inc, Warrington, Pa) sont rajoutés à l'échantillon en tant que standard interne avant son passage dans le cytomètre de flux (FACS-Calibur, Becton Dickinson). Après excitation individuelle des cellules de l'échantillon par un faisceau laser argon de longueur d'onde 488 nm, chaque cellule reémet des signaux de diffusion lumineuse et des signaux de fluorescence. Les signaux lumineux réfléchis et réfractés à  $90^\circ$  (grand angle) donnent une information sur la granulométrie ou complexité des cellules ce qui constitue le signal SSC (*side scatter*). Les signaux de fluorescence sont mesurés dans le domaine de longueur d'onde  $530 \pm 15 \text{ nm}$  (vert).

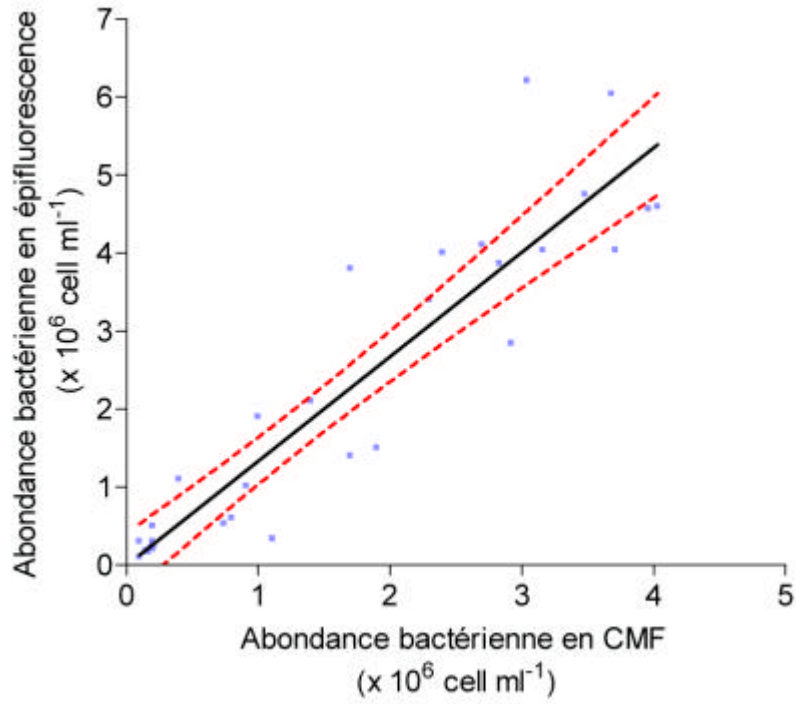


Figure 3.1 : Corrélation entre les comptages bactériens en épifluorescence et en cytométrie de flux (CMF). Les pointillés rouges représentent les intervalles de confiance à 95 % dans lesquels la pente peut varier de 1.18 à 1.50.

Le calcul des biovolumes bactériens s'effectue selon la formule :

$$BV = 0.6636 \times SSC + 0.0166$$

Où BV correspond au biovolume en  $\mu\text{m}^3$  et SSC (*side scatter*) aux rayons réfléchis et réfractés à  $90^\circ$  par les bactéries.

### 3.2. Analyse morphologique et morphométrique du virioplancton

L'analyse de la diversité des populations virales le long de l'estuaire de la Charente a été réalisée sur un plan morphologique et morphométrique par microscopie électronique à transmission (MET). En permettant l'observation des différentes morphologies de virus, la MET a été la première méthode donnant accès à la diversité virale (Wommack et Colwell 2000). Les critères morphologiques obtenus par cette méthode sont communément utilisés en virologie dans la classification des virus. Le diamètre des capsides étant un caractère conservatif parmi les bactériophages (Ackermann 1987), la mesure de ces diamètres permet d'obtenir un autre aspect de la diversité virale en analysant les fréquences de distribution des tailles de capsides.

En dehors du suivi annuel où la diversité morphologique et morphométrique des communautés virales a été analysée au niveau des stations A, D, E et Oc, la diversité virale a été mesurée mensuellement de mai 2002 à juillet 2004 aux stations A et E et notamment au moment des expériences *in vitro*.

#### 3.2.1. Concentration et purification des particules virales

Il a été choisi d'utiliser le protocole de préparation des échantillons pour MET décrit par Montanié et al. (2002) car il offre l'avantage de réduire les interférences dues aux fortes concentrations en MES lors de l'observation des PAV sur les grilles de microscopie. Les échantillons sont fixés au moment du prélèvement avec du formol (2 % concentration finale) filtré  $0.2 \mu\text{m}$ , puis conservés à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'au laboratoire. La première étape du protocole est une étape de clarification permettant l'élimination des MES, des bactéries et des autres microorganismes. Pour cela, six tubes de 37 ml contenant 36.5 ml d'échantillon sont centrifugés pendant 30 min à  $4900g$  ( $4^\circ\text{C}$ , ultracentrifugeuse LE 70 Beckman, rotor SW 28.1). Dans chaque tube, 36 ml de surnageant contenant les virus sont récupérés et concentrés pendant 3.5 h à  $150000g$  ( $4^\circ\text{C}$ , ultracentrifugeuse LE 70 Beckman, rotor SW 28.1). Après

élimination du surnageant, les particules virales contenues dans le culot sont remises en suspension dans 100 µl de tampon TN (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4).

### 3.2.2. Préparation des grilles de microscopie

Avant fixation des particules virales sur les grilles de microscopie, une couche de collodion et de carbone est déposée sur celles-ci au moins 24 h avant. L'étape de fixation des particules virales débute par le dépôt d'une goutte de 20 µl de suspension virale sur du papier parafilm. Une grille de microscopie est ensuite déposée face collodionnée et carbonée sur cette goutte pendant 3 min afin que les particules virales migrent sur la grille par capillarité. La grille est ensuite contrastée négativement par dépôt de celle-ci sur une goutte (20 µl) d'acide phosphotungstique (PTA, pH 7) pendant 3 min. L'excès de PTA est enlevé délicatement avec le coin d'un papier Whatman.

### 3.2.3. Mesure de la diversité morphologique et morphométrique

L'observation des grilles a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Jeol JEM 2011) fonctionnant à 200 kV et calibré avec des grilles de graphite. Les PAV ont été comptées sur deux grilles par échantillon et au moins 15 champs microscopiques par grille ont été numérisés à un grossissement de 50000× afin d'obtenir au moins 100 PAV par grille. L'analyse des PAV sur les images numérisées a été effectuée avec le logiciel Analysis (Olympus).

Quatre types de morphologie ont été retenus pour la classification morphologique des bactériophages caudés :

- Capside isométrique et longue queue non contractile → particules ressemblant aux siphovirus (morphotype B1)
- Capside allongée et longue queue non contractile → particules ressemblant aux siphovirus (morphotype B2)
- Capside isométrique et queue contractile (présence d'un cou entre la capsid et la queue) particules ressemblant aux myovirus (morphotype A1)
- Capside isométrique et très courte queue → particules ressemblant aux podovirus (morphotype C1)



Pour l'analyse morphométrique, les virus totaux (particules non caudées + particules caudées) et les virus caudés ont été séparés en six classes de taille de capsid : 20 – 44, 45 – 64, 65 – 84, 85 – 104, 105 – 124 et > 125 nm. L'abondance des PAV à l'intérieur d'une classe a été calculée en multipliant l'importance relative (%) de la classe de taille (obtenue par MET) par l'abondance virale totale trouvée par microscopie en épifluorescence.

### 3.3. Analyse de la diversité génomique du virioplancton

Cette analyse a été effectuée par électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Dans cette technique, les génomes viraux entiers sont séparés selon leur taille après extraction du matériel génétique viral provenant des particules concentrées par ultrafiltration et/ou ultracentrifugation. Il a donc été nécessaire dans un premier temps d'adapter les techniques de concentration des particules virales à un milieu présentant de fortes charges en matière en suspension.

#### 3.3.1. Purification et concentration des particules virales

Après prélèvement, les échantillons sont conservés dans des bouteilles NALGENE (8 l) opaques en polypropylène jusqu'au laboratoire. Afin d'éliminer les plus gros éléments particulaires et diminuer la forte charge en MES, le traitement des échantillons commence par un tamisage sur une série de tamis de porosité 250, 132, 80, 63, 46 et 25  $\mu\text{m}$  (Figure 3.2). L'eau tamisée est filtrée sur un trépied de filtration équipé successivement de préfiltres et filtres Sartorius en nitrate de cellulose (142 mm de diamètre) de 1.2 et 0.2  $\mu\text{m}$  de porosité. Elle ne contient donc que les particules inférieures à 200 nm dans lesquelles sont comprises les PAV. Les bactéries sont quant à elles, retenues sur le filtre 0.2  $\mu\text{m}$ . A la suite de ce traitement, le titre viral obtenu dans l'eau 0.2  $\mu\text{m}$  est diminué de 32 % par rapport au titre initial. L'introduction d'une phase de décantation de l'eau tamisée (12 h, 4°C, bouteilles NALGENE opaque) avant les filtrations permet de diminuer le colmatage du préfiltre et de réduire la perte virale à 7 % par rapport au titre initial.

Les particules virales contenues dans 5 l d'eau 0.2  $\mu\text{m}$  sont ensuite concentrées par ultrafiltration tangentielle (support ULTRASLICE, membrane en polysulfone de 30 kDa de seuil de coupure, Sartorius) jusqu'à un volume final de 150 ml.

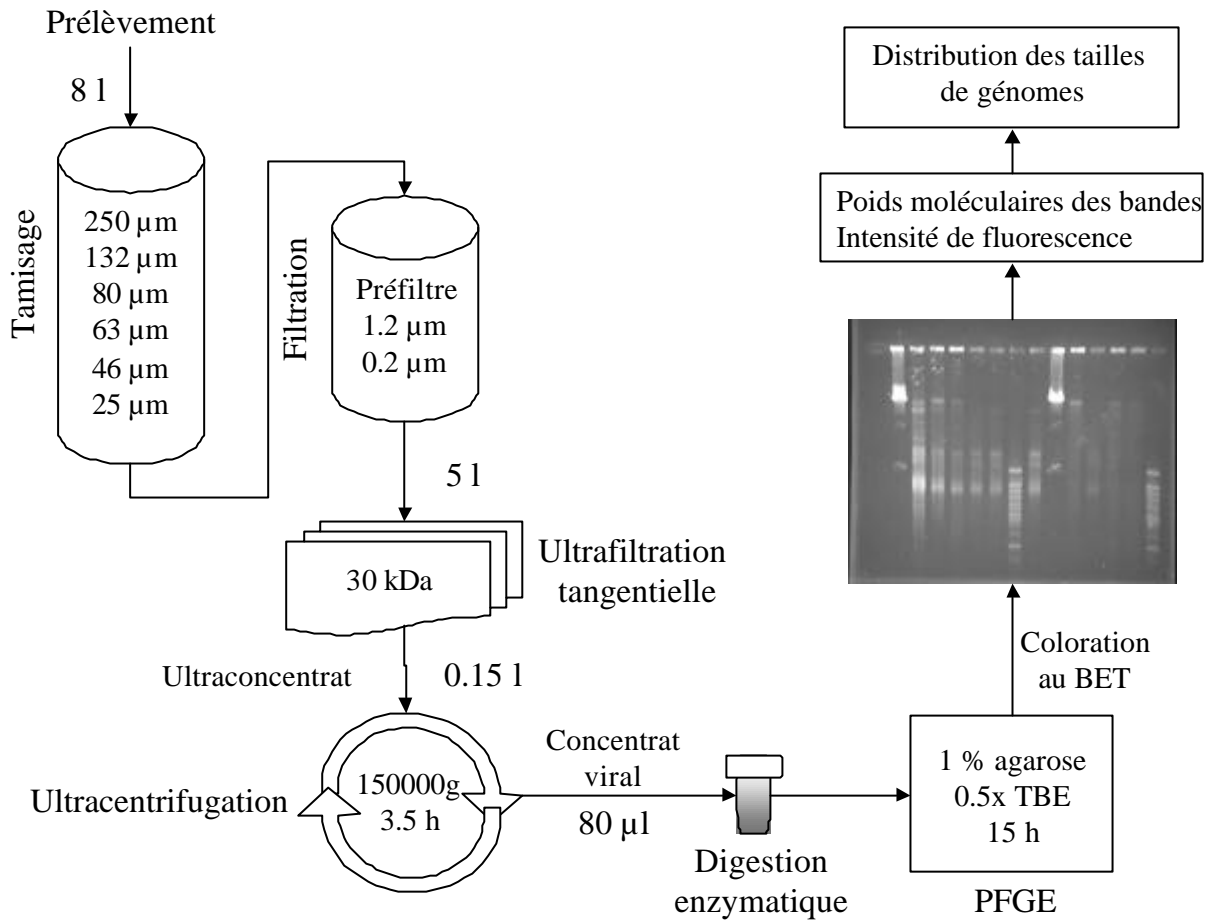


Figure 3.2 : Schéma du protocole utilisé pour mesurer la diversité génomique virale

Le volume ultrafiltré destiné à fournir le concentrat viral a été défini en fonction de trois paramètres :

- le colmatage du préfiltre et du filtre 1.2  $\mu\text{m}$  par les MES
- le rendement d'ultrafiltration qui correspond au calcul :  $FC / VRF$  où FC représente le facteur de concentration (titre viral initial / titre viral dans le concentrat) et VRF le facteur de réduction volumique (volume initial / volume du concentrat).
- la quantité finale de virus nécessaire pour obtenir un signal détectable en PFGE. La plus faible quantité détectée ayant été de  $3.92 \times 10^7$  particules virales.

Dans l'absolu, plus le volume initial à filtrer est important, plus la quantité de particules virales dans le concentrat est importante et plus le signal est fort en PFGE. Cependant, le colmatage rapide du préfiltre et du filtre 0.8  $\mu\text{m}$  par les MES empêche la filtration de volumes trop importants. De plus, l'ultrafiltration d'un volume de 20 l entraîne un rendement d'ultrafiltration très faible (12 %, Mauhourat 2001) alors qu'un volume de 2 l permet d'obtenir un bon rendement (67 %, Mauhourat. 2001) mais trop de peu de particules virales détectables par PFGE. Le meilleur compromis a été obtenu avec un volume ultrafiltré de 5 l, une pression d'entrée de 0.7 bar, une pression de sortie de 0.1 bar et un débit du filtrat de  $400 \text{ ml min}^{-1}$ . Avec ces réglages, le rendement d'ultrafiltration a été en moyenne de  $50 \pm 6$  % (n=17).

Après ultrafiltration, la concentration des virus ( $6 \times 37 \text{ ml}$ ) est accentuée par ultracentrifugation pendant 3.5 h à une vitesse de 150000g (4°C, ultracentrifugeuse LE 70 Beckman, rotor SW 28.1). Le culot de centrifugation est repris dans 80  $\mu\text{l}$  de tampon SM (0.1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris - HCl, 0.005 % (p / v) glycerine).

### 3.3.2. Préparation des plugs et migration des génomes viraux

Afin d'éviter la cassure des génomes viraux, les virus concentrés sont inclus dans des *plugs* (cubes) d'agarose à bas point de fusion (*low melting*) à 1.5 % (certified megabase agarose, Bio-rad) par mélange d'un même volume (20  $\mu\text{l}$ ) de concentrat viral et d'agarose (Wommack et al. 1999). Une attention particulière a été portée sur le fait de mettre à peu près la même quantité de particules virales ( $\approx 2 \times 10^9$ ) dans chaque plug. Pour cela, les concentrats viraux ont été systématiquement titrés par microscopie en épifluorescence.

La destruction des capsides virales s'opère en immergeant les *plugs* dans 500 µl de solution de digestion (250 mM EDTA, 1% SDS, 1mg ml<sup>-1</sup> de protéinase K) à 30°C toute la nuit. Les *plugs* sont ensuite lavés trois fois dans 1 ml de TE (10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 8.0) puis conservés dans 1 ml de TE 20:50 (20 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0) à 4°C jusqu'au moment de la PFGE (Genepath<sup>tm</sup> modifié par le logiciel « open channel », ver. 2.0, Bio-Rad). Pour chaque migration, deux marqueurs de taille (concatémère du phage lambda et un marqueur de taille 8 – 48 kb, Bio-Rad) sont traités comme les échantillons et introduits dans des *plugs*. Chaque puits est ensuite recouvert de 30 µl d'agarose à 1.5 %.

La migration électrophorétique des concentrats se déroule dans un gel d'agarose 1 % (Bio-Rad) et du tampon TBE 0.5X pendant 15 h à 14°C sous une tension de 6 V cm<sup>-1</sup>. La majorité des génomes viraux étant compris entre 10 et 200 kb (Riemann et Middelboe 2002), l'électrophorèse a été programmée pour obtenir la meilleure discrimination des bandes dans cette gamme de taille de génomes. Trois temps de *pulse* successifs sont utilisés :

- 10 - 20 s pendant 1 h → séparation des génomes compris entre 50 et > 200 kb
- 1 - 5 s pendant 12 h → séparation des génomes compris entre 50 et 10 kb
- 0.1 - 2 s pendant 2 h → séparation des génomes < 10 kb

Les gels sont colorés à l'obscurité avec du bromure d'ethidium (BET, 0.5 µg ml<sup>-1</sup>, Bio-Rad) pendant 20 min puis lavés avec de l'eau MilliQ (Millipore) pendant le même temps afin d'éliminer l'excès de BET.

### 3.3.3. Acquisition et traitement des profils électrophorétiques

L'acquisition des images a été obtenue grâce au système Gel doc 2000 (Bio-Rad) équipé d'une caméra numérique. L'analyse quantitative des résultats obtenus (mesure des poids moléculaires, mesure de l'intensité de fluorescence des différentes bandes et comparaison des profils) a été réalisée grâce au logiciel Diversity data base (Bio-Rad).

Le poids moléculaire de chaque bande est obtenu par comparaison de la distance de migration avec les marqueurs de taille.

Afin de déterminer le nombre de copies de génomes présentes dans une bande, nous avons réalisé une droite d'étalonnage permettant de relier l'intensité de fluorescence à la quantité d'ADN présente dans une bande (Figure 3.3).

Pour chaque gel réalisé, le marqueur de taille 8 – 48 kb a été utilisé afin de tracer cette droite. Le nombre de copies de génomes dans une bande est ensuite obtenu par le calcul suivant :

$$C_i = (D_i \times A_v) / M_i$$

où  $C_i$  représente le nombre de copies de génomes,  $D_i$  la quantité d'ADN en g,  $A_v$  le nombre d'Avogadro ( $6.022 \times 10^{23}$ ) et  $M_i$  le poids moléculaire en kDa. La conversion du poids moléculaire exprimé en kb en kDa, se fait en multipliant par un facteur 660 correspondant au poids moléculaire moyen d'une paire de base. Pour faciliter la comparaison de l'abondance de chaque taille de génome viral sur les différents profils obtenus, le nombre de copies d'un génome a été divisé par la quantité totale de copies dans l'échantillon. Chaque génome viral obtenu est ainsi exprimé en abondance relative (Steward et al. 2000).

### 3.4. Diversité bactérienne

La diversité des communautés bactériennes mesurée lors des expériences *in vitro* a été réalisée par la technique de PCR-SSCP (polymerase chain reaction – single strand conformation polymorphism : polymorphisme de conformation monocaténaire). Dans cette technique, chaque phylotype est séparé selon la séquence d'une zone variable (200 bp) de son ADNr 16S.

Dans le cas des échantillons d'eau brute, un aliquot de 300 ml préfiltré sur 5  $\mu\text{m}$  a été tout d'abord filtré sur filtre en polycarbonate (Sartorius) de 0.2  $\mu\text{m}$  de porosité et conservé à – 20°C. Les échantillons (300 ml) provenant des Erlenmeyers ont été traités de la même manière sans l'étape de préfiltration 0.5  $\mu\text{m}$ . Les filtres sont ensuite découpés et introduits dans des microtubes contenant 2 ml de tampon de lyse (40 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.75 M saccharose).

Pour les amplifications en PCR, les amorces bactériennes W49 dir (*Escherichia coli* Position 331 ; 5'-ACG-GTC-CAG-ACT-CCT-ACG-GG-3') ; et W34 rev (*E. coli* Position 533 ; 5'-TTA-CCG-CGG-CTG-CTG-GCA-C-3') marquées en position 5' avec de la fluorescéine phosphoramidite TET (Applied biosystems) ont été utilisées. Les deux amorces ciblent des régions universelles de l'ADNr 16S bactérien.

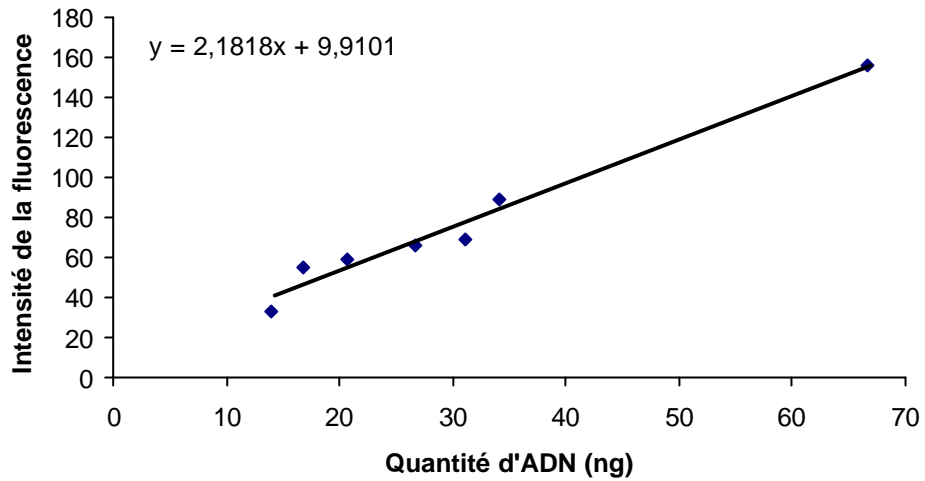


Figure 3.3 : Exemple de droite d'étalonnage permettant de calculer la quantité d'ADN présente dans une bande à partir de l'intensité de fluorescence (réalisé à partir du marqueur de taille 8 – 48 kb).

La PCR commence par un premier cycle de 2 min à 94°C (dénaturation), suivi de 25 cycles d'amplification et d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min selon la procédure décrite dans Delbès et al. (2000). Chaque cycle consiste en une dénaturation à 94°C (30 s), une étape de fixation des amorces à 61°C (30 s) et en l'étape d'élongation à 72°C pendant 30 s. La pureté et la taille des produits de PCR ( $\approx$  200 bp) sont vérifiés sur un gel d'agarose à 2 %. Les amplicons sont ensuite purifiés sur colonne (QIAGEN PCR Purification kit) pour éliminer les amorces et éviter ainsi qu'ils n'interfèrent par la suite dans la conformation de l'ADN simple brin et forment des pics de SSCP artéfactuels.

Pour les analyses en SSCP, les amplicons sont dénaturés à 94°C pendant 5 min et placés immédiatement dans de la glace pendant au moins 10 min. Un standard interne (Genescan-400 rox, Applied biosystems) marqué par une molécule fluorescente est ajouté aux échantillons et permet de pouvoir aligner différents profils. L'électrophorèse SSCP s'effectue sur un analyseur ABI 310 équipé d'un capillaire selon la procédure du fournisseur (Applied Biosystems). Les conditions d'électrophorèse sont décrites dans Delbès et al. (2000).

Ces analyses de la diversité bactérienne ont été réalisées à l'observatoire océanologique de Banyuls.

### 3.5. Activité bactérienne

Tous les échantillons destinés aux mesures des activités bactériennes ont été conservés à la température *in situ* dans des flacons lavés à l'acide (HCl 10 %) et rincés à l'eau MilliQ jusqu'au laboratoire. Les incubations nécessaires à la mesure des activités bactériennes ont été initiées le plus rapidement possible, dès le retour au laboratoire ( $t < 3 - 4$  h).

#### 3.5.1. Production bactérienne

##### 3.5.1.1. Choix de la méthode

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer la production bactérienne (Azam et Fuhrman 1984). Pour des raisons de simplicité de protocole et la présence de l'expertise au CREMA l'Houmeau, la technique par incorporation de la thymidine tritiée (Fuhrman et Azam 1980, 1982) pour mesurer la synthèse de matériel génétique a été choisie. Cette méthode est spécifique des bactéries hétérotrophes dans des expériences de courtes durées (Moriarty

1986), car l'enzyme permettant l'incorporation de la thymidine (thymidine kinase) est absente chez la plupart des autres microorganismes (champignons, cyanobactéries et microalgues).

Cette technique comporte tout de même certaines incertitudes comme l'utilisation de facteurs de conversion pour transformer les taux d'incorporation de thymidine en quantité de cellules produites par unité de volume et de temps. Ducklow et Carlson (1992) ont reporté des valeurs variant entre  $1 \times 10^{17}$  et  $6 \times 10^{19}$  cell mol<sup>-1</sup> pour une moyenne de  $2 \times 10^{18}$  cell mol<sup>-1</sup>. En fonction du facteur choisi, la production bactérienne cellulaire peut varier d'un facteur 600. Il a été choisi d'utiliser la valeur moyenne de  $2 \times 10^{18}$  cell mol<sup>-1</sup> qui se rapproche du facteur de conversion ( $3 \times 10^{18}$  cell mol<sup>-1</sup>) défini expérimentalement dans un marais expérimental du CREMA l'Houmeau (Crottereau 1998).

#### 3.5.1.2. Protocole

Les échantillons (5ml) sont incubés pendant 30 à 60 min à la température *in situ* et à l'obscurité avec une concentration finale en méthyl-thymidine tritiée (<sup>3</sup>H] TdR, activité spécifique : 50 Ci mmole<sup>-1</sup>) de 40 nM. Tous les échantillons sont réalisés en triplicats et avec un témoin recevant 0.75 ml d'acide trichloroacétique (TCA) froid à 50 % dès l'introduction de <sup>3</sup>H] TdR. Après incubation, l'incorporation de <sup>3</sup>H] TdR dans les échantillons est arrêtée par addition (0.75 ml, concentration finale 5 % en TCA) de TCA froid à 50 %. Après une phase d'extraction et de précipitation des échantillons pendant 20 min dans la glace, les échantillons sont filtrés sur filtres Nucléopore (0.2 µm, pression < 50 mm Hg) puis lavés plusieurs fois avec 2 ml de TCA froid à 5 % pour éliminer l'excédent de <sup>3</sup>H] TdR non incorporé. Les filtres sont ensuite placés dans des flacons à scintillation recevant 5 ml de liquide scintillant (Ultima Gold, Packard) puis la radioactivité est mesurée par scintillation liquide.

### 3.5.2. Activité ecto-protéolytique (AEP)

#### 3.5.2.1. Principe et méthode choisie

La matière organique dissoute (MOD) dans les écosystèmes aquatiques est essentiellement constituée de polymère non assimilable directement par les bactéries. Pour pouvoir utiliser ces macromolécules, les bactéries doivent les hydrolyser par l'intermédiaire



d'enzymes extracellulaires. Une majorité de ces enzymes extracellulaires sont d'origine bactérienne (Hollibaugh et Azam 1983).

Le principe des méthodes permettant le dosage de l'AEP est basé sur l'utilisation de substrats analogues aux protéines comportant une partie peptidique liée par une liaison peptidique à un fluorochrome (Hoppe 1983). Pour sa grande sensibilité et sa stabilité nous avons utilisé la L-leucine-4-méthyl-7-Coumarinylamide (LLMCA).

#### 3.5.2.2. Protocole

Le témoin et les échantillons (en duplicats, 2 ml) sont incubés de 0.5 à 6 h à la température *in situ* et à l'obscurité avec de la LLMCA (1000 nM, concentration finale). La réaction est arrêtée par addition de 200 µl de sodium dodecyl sulfate 10 % (SDS, 1 % concentration finale, Delmas et Garet 1995). Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'aux analyses. La molécule fluorescente (7-amino-4-methylcoumarine) libérée par l'hydrolyse du substrat est dosée sur un système d'analyse en flux continu non segmenté et la détection est réalisée en fluorescence (Kontron, modèle SFM 25). La fluorescence est mesurée à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 380 et 440 nm respectivement (Delmas et al. 1994).

## 4. Paramètres environnementaux et physico-chimiques

### 4.1. Dosages des pigments chlorophylliens

De 25 à 500 ml d'échantillon ont été filtrés sur filtres Whatman GF/F (47 mm) directement à bord du chaland pour le dosage de la chlorophylle a et des phéopigments. Le volume filtré a été adapté en fonction de la turbidité de l'eau afin d'éviter le colmatage des filtres pouvant entraîner la destruction des cellules planctoniques. Les filtres sont ensuite congelés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction. L'extraction des pigments se fait dans des tubes à centrifugation, à l'obscurité et à 6°C, par addition de 6 ml d'acétone à 90 % sur les filtres préalablement coupés en morceaux. Après 12 heures d'extraction, les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 5000 tours min<sup>-1</sup> et la fluorescence du surnageant d'extraction,

avant et après acidification, est mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Kontron) selon le protocole décrit par Yentsch et Menzel (1963).

#### 4.2. Mesure des matières en suspension (MES)

Les échantillons d'eau destinés au dosage des MES sont filtrés sur filtres Whatman GF/F (47 mm) préalablement calcinés à 490°C pendant 2 heures et pesés. En fonction de la turbidité, entre 50 et 300 ml d'échantillon ont été filtrés. Afin d'éliminer les sels, les filtres ont été systématiquement lavés avec  $7 \times 1$  ml d'eau distillée à la fin de chaque filtration. Après filtration, les filtres sont séchés pendant 12 heures dans une étuve à 60°C puis pesés pour déterminer la masse des MES totales (Aminot 1983). Les MES minérales correspondent à la masse des particules calcinées pendant 2 heures à 490°C dans un four à moufle (Carbolite Furnaces, type CSF 1200).

#### 4.3. Dosage des sels nutritifs

L'azote minéral (N-NO<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NH<sub>4</sub>), l'urée, le phosphore minéral (P-PO<sub>4</sub>) et la silice (Si(OH)<sub>4</sub>) sont dosés par un auto-analyseur SKALAR à flux continu selon le protocole de Strickland et Parsons (1972).

#### 4.4. Estimation du carbone organique dissous (COD)

Les concentrations en carbone organique dissous (COD) sont estimées par spectrophotométrie (Pages et Gadel 1990, Pages et al. 1997). Dans cette méthode, le spectre d'absorption (244 – 374 nm) des échantillons d'eau est mesuré dans des cuves en quartz de 10 cm de trajet optique. La concentration en COD est donnée par le calcul suivant :

$$[\text{COD}] = 0.6667 A_{254} / (0.0304 - |S|)$$

où [COD] représente la concentration en COD en mg C l<sup>-1</sup>, A<sub>254</sub> l'absorbance mesurée à 254 nm et |S| la valeur absolue de la pente du log des absorbances mesurées aux longueurs d'onde (254 – 374 nm).

## 4.5. Paramètres physico-chimiques

Température et salinité ont été mesurées à l'aide d'un thermo-salinomètre (WTW de type LF196). Les débits sont mesurés quotidiennement au niveau du barrage de St Savinien et ils nous ont été communiqués par la Direction Régionale de l'Environnement (DIREN) de Bordeaux.

## 5. Suivi mensuel

Des campagnes mensuelles d'échantillonnages ont été réalisées pendant une période de 13 mois d'avril 2002 à avril 2003. Afin de parfaitement caractériser le milieu lors des campagnes d'échantillonnages et de déterminer les paramètres influençant les distributions virales et bactériennes, l'analyse des paramètres microbiologiques et environnementaux répertoriés dans le Tableau 5.1 a été effectuée.

Tableau 5.1 : Variables microbiennes et environnementales mesurées durant le suivi annuel et les expériences d'enrichissement *in vitro*.

Paramètres mesurés	Suivi annuel	Expériences <i>in vitro</i>	
		à long terme	à court terme
Abondance microbienne:			
-virus	✓	✓	✓
-bactéries			
Diversité morphologique du virioplancton	✓	✓	
Diversité génomique du virioplancton	✓	✓	
Diversité bactérienne		✓	
Activité bactérienne:			
-production	✓	✓	
-ecto-protéolytique			
Concentration en chl <i>a</i> et phéopigments	✓		
Concentration en MES	✓		
Concentration en sels nutritifs	✓	✓	
Concentration en COD	✓	✓	

## 6. Expérimentations *in vitro*

Dans le but de déterminer si les particules virales dulçaquicoles sont capables d'infecter les populations bactériennes présentes dans le bassin de Marennes Oléron, des expériences d'enrichissement viral sur des populations naturelles bactériennes du bassin ont été réalisées. Deux types d'expériences ont été créées :

- Des expériences à court terme pour déterminer le potentiel infectieux des virus dulçaquicoles sur les bactéries du bassin.
- Des expériences à long terme pour déterminer les conséquences de ces infections sur les structures des communautés virales et bactériennes ainsi que sur la libération de nutriments dans le milieu.

L'eau nécessaire pour la réalisation des concentrats viraux et les incubations a été prélevée au niveau des stations E (panache de l'estuaire de la Charente) et A (Charente) pendant les mois de novembre 2003, février 2004, mars 2004, juin 2004 et juillet 2004 (Figure 6.1). Pour toutes les campagnes, les prélèvements ont été effectués sur les deux stations de manière simultanée. Tous les prélèvements ont été réalisés en sub-surface (0 – 1 m) à mi-jusant de vives eaux.

Pendant tout le temps séparant le moment du prélèvement de celui du début des incubations (e. g. transport et traitements), l'eau a été maintenue à la température *in situ*. Les expériences à court et long terme ont été réalisées simultanément pour les mois de février, mars, juin et juillet 2004.

Les différentes variables mesurées au cours de ces expériences sont listées dans le Tableau 5.1. Les modalités du traitement des échantillons ainsi que les protocoles de chaque type d'expérience sont détaillés dans la partie 4 de ce manuscrit.

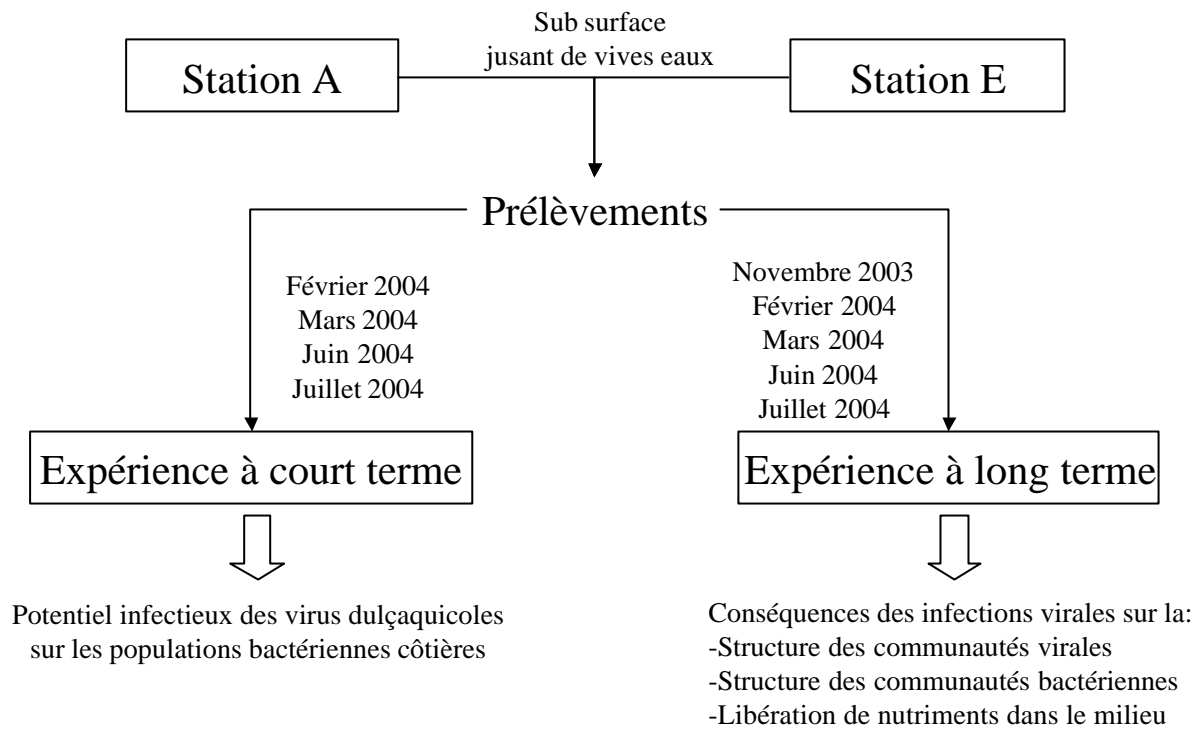


Figure 6.1: Plan d'échantillonnage des expérimentations *in vitro*.

## Partie 3 : Etude *in situ*

Dynamique et structure des communautés virales de l'estuaire de la  
Charente et du bassin de Marennes Oléron

## 1. Introduction

Le bassin de Marennes étant l'un des centres conchylicoles les plus importants d'Europe, la majorité des études écologiques réalisées au niveau de ce bassin ou de l'estuaire de la Charente se rapportent aux relations huîtres – milieu (Gras et al. 1971, Barusseau 1973, Leborgne-David 1973, Berthome et al. 1978). Des études plus récentes concernant l'influence de la Charente sur la capacité biotique du bassin de Marennes Oléron (Ravail-Legrand 1993) et le devenir de la matière organique dans l'estuaire de la Charente (Riera 1995) ont documenté la dynamique de divers paramètres environnementaux mais toujours sous l'angle phytoplanctonique dans le cas des paramètres biologiques. De fait, aucunes données concernant la dynamique de paramètres microbiologiques dans l'estuaire de la Charente n'étaient disponibles avant notre étude.

Les deux chapitres qui suivent concernent donc un suivi *in situ* mensuel réalisé d'avril 2002 à avril 2003. Ces deux chapitres sont présentés sous forme de publications en anglais. La première traite de la dynamique des abondances virales et des facteurs environnementaux la contrôlant et la deuxième traite de la diversité virale le long du gradient de salinité de l'estuaire de la charente.

## 2. Dynamic of virioplankton abundance and its environmental control in the Charente Estuary (France)

From the paper in press in *Microbial Ecology* (Auguet J-C, Montanié H, Delmas D, Hartmann H-J et Huet V)

### 2.1. Abstract

The Charente River provides nutrient and virus-rich freshwater input to the Marennes Oléron Basin, the largest oyster producing region in Europe. In order to evaluate virioplankton distribution in the Charente Estuary and identify which environmental variables control dynamic of virioplankton abundance, five stations defined by a salinity gradient (0-0.5, 0.6-5, 13-17, 20-24 and higher than 30 PSU) were surveyed over a year. Viral abundance was related to bacterioplankton abundance and activities, photosynthetic pigments, nutrient concentration and physical parameters (temperature and salinity). On a spatial scale, virus displayed a decreasing pattern seaward with abundance ranging over the sampling period from  $1.4 \times 10^7$  to  $20.8 \times 10^7$  viruses  $\text{ml}^{-1}$  making virioplankton the most abundant component of planktonic microorganisms in the Charente Estuary. A good correlation was found between viral and bacterial abundance ( $r_s = 0.85$ ). Furthermore, bacterial abundance was the most important predictor of viral abundance explaining alone between 66 % (Winter) and 76 % (Summer) of viral variability. However, no relation existed between viral abundance and chlorophyll *a*. Temporal variations in viral distributions were mainly controlled by temperature through the control of bacterial dynamics. Spatial variations of viral abundance were influenced by hydrodynamic conditions especially during the winter season where virioplankton distribution was entirely driven by mixing processes.



## 2.2. Introduction

Viruses are now well established to form an important component of the microbial food web in a great variety of aquatic environments (Fuhrman et Suttle 1993, Thingstad et al. 1993, Fuhrman 1999). Viral abundance from world wide aquatic ecosystems (oceans, rivers, lakes, salt marshes, polar seas...) range from  $10^4$  to  $10^8$  particles  $\text{ml}^{-1}$  (Wommack et Colwell 2000) often exceeding bacterial numbers by an order of magnitude (Proctor et al. 1988, Bergh et al. 1989). Such an important abundance implies a strong viral production and thus numerous lyses of host microorganisms in aquatic environments. Through their lytic activity, viruses participate in the control of population size and diversity of many microbial food web members, such as bacteria (Steward et al. 1996, Fuhrman 1999, Wilhelm et Suttle 1999), cyanobacteria (Fuhrman et Suttle 1993, Suttle et Chan 1994) and eukaryotic phytoplankton (Suttle 1994, Cottrell et Suttle 1995, Suttle 1999). They thus occupy a trophic role equivalent to that of phagotroph predators (Bratbak et Haldal 1995, Garza et Suttle 1995, Weinbauer et Höfle 1998). Lytic destruction of host cells have other ecological implications, such as genetic exchanges between prokaryotic cells (Jiang et Paul 1998) and participation in biogeochemical nutrient cycling (Proctor et Fuhrman 1991, Fuhrman et Suttle 1993, Thingstad et al. 1993, Bratbak et al. 1994, Gobler et al. 1997, Wilhelm et Suttle 1999, Wommack et Colwell 2000).

Previous studies on viral distributions in aquatic environments revealed positive correlations with bacterioplankton distributions (Wommack et Colwell 2000, Hewson et al. 2001) and with chlorophyll *a* (Maranger et Bird 1995). Some studies also showed higher viral counts with higher trophic states (Haldal et Bratbak 1991, Cochlan et al. 1993, Maranger et Bird 1995) but a recent work carried out on a large spatial scale in the Adriatic Sea found no direct link between changes in virioplankton abundance and trophic conditions (Corinaldesi et al. 2003). Overall, attempts to predict dynamic of virioplankton abundance in aquatic ecosystems revealed relations to environmental parameters affecting activities and abundance of hosts, primarily bacterioplankton.

While the distribution of virioplankton in freshwater and marine environments is well documented (Wommack et Colwell 2000, Corinaldesi et al. 2003) few reports concern dynamic of viral abundance in temperate (Wommack et al. 1992, Cochlan et al. 1993, Almeida et al. 2001b) or subtropical estuaries (Jiang et Paul 1994, Cochran et Paul 1998, Hewson et al. 2001). Besides, there is a lack of comprehension of factors influencing seasonal dynamics of viruses in estuaries.

The Charente Estuary drains into the Marennes Oléron Basin. The basin receives nutrient rich freshwater from several rivers (Charente, Gironde and Seudre) and from coastal marshes draining brooks. In summer, 90 % of freshwater input to the basin comes from the Charente River (Ravail-Legrand 1993). The present study is a part of a global work that will assess the role of freshwater viral particles in the dynamics of coastal bacterial populations.

The aim of this work was to (1) evaluate the spatial and seasonal virioplankton distribution in the Charente Estuary and (2) identify which environmental and biological variables shape virioplankton distribution along estuarine gradients (e.g. salinity, nutrients) over the seasons (e.g. temperature and hydrodynamics). To perform this, temporal and spatial distributions of viral abundance were related to bacterioplankton abundance and activities, photosynthetic pigments, physical parameters and inorganic as well as organic nutrient concentrations.

## 2.3. Materials and methods

### 2.3.1. Study site

The Marennes Oléron Basin and the Charente Estuary are located on the French Atlantic Coast (45° 59' 06"N, Figure 2.1). The basin is a shallow (5 m average depth) embayment characterised by a macrotidal system, and a short seawater residence time (4 to 10 days, Laboratoire Central Hydraulique de France). The Charente is the major river discharging into the Marennes Oléron Basin with a mean annual discharge of  $60 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Figure 2.2). The Charente has a drainage area of approximately 10000 km<sup>2</sup> dominated by farming area. Brackish water extends approximately 30 km upstream from the mouth. The Charente Estuary is a tidally dominated estuary displaying a tidal range of 7 m at spring tide. Tidal influence is prevented by a dam at the level of Saint Savinien (50 km upstream from the mouth).

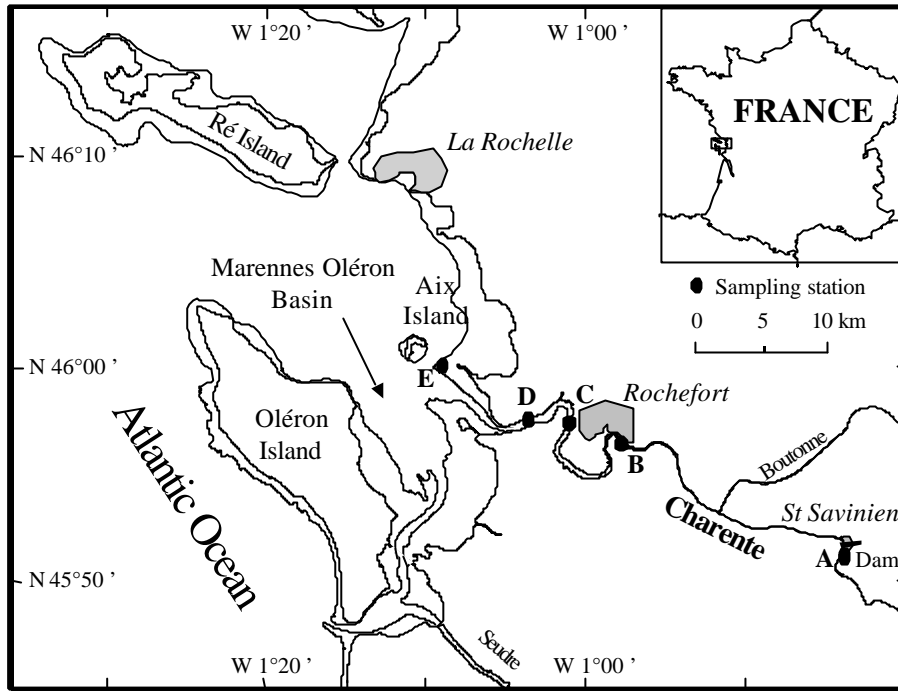


Figure 2.1: Location of sampling stations (median position over 13 sampling dates) along the Charente Estuary (map source: P. Richard, CREMA, L’Houmeau, France).

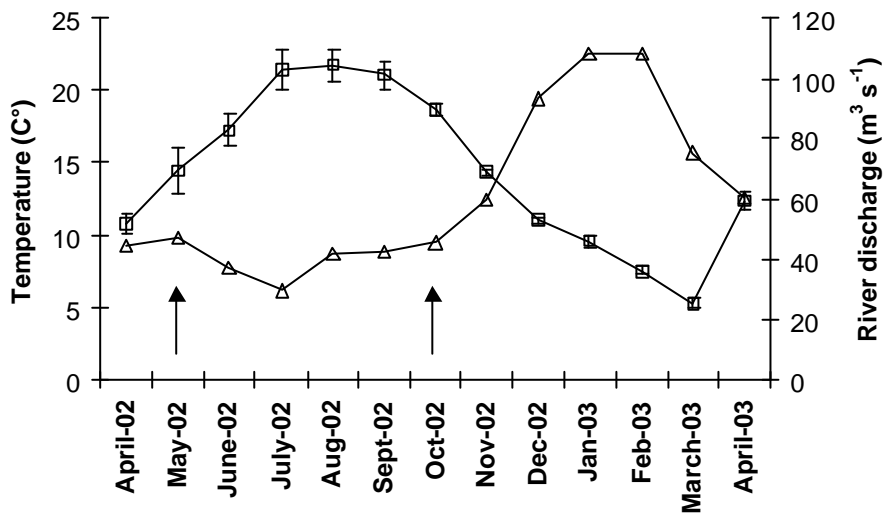


Figure 2.2: Temperature (T, squares) and river discharge (R, triangles) in the Charente Estuary measured for each sampling date of the study. Each temperature value represents the mean of the five estuarine stations  $\pm$  standard deviation (error bars). The two arrows indicate major storms.

### 2.3.2. Sampling strategy

Sampling in the Charente Estuary was undertaken when the influence of river waters was maximal on the Marennes Oléron Basin. Water samples were thus collected monthly at the ebb cycle of spring tide from April 2002 to April 2003 with the flat-bottom oceanographic barge “ESTRAN”. The study area extends from Saint Savinien (station A, upstream from the dam, 0.2 PSU) to the South East of Aix Island (station E, > 30 PSU) over 50 km with a turbidity maximum between 19 and 26 km (2 to 5 PSU). Five stations (A, B, C, D and E) characterised by five salinity classes (0-0.5, 0.6-5, 13-17, 20-24 and greater than 30 PSU) were sampled. Station locations are shown in Figure 2.1. In order to establish a suitable sampling strategy, pre-sampling was carried out crosswise of the stream direction at station A. This allowed us to evaluate the variability of viral and bacterial abundance due to (a) the spatial variability, (b) the treatment of the samples and (c) subsampling by a hierarchical ANOVA sampling design. Total variability (a, b and c combined) of viral and bacterial abundance did not exceed a coefficient of variation of 3 %. Most of that variability (70 % of the total) was due to treatment of the samples (b) and subsampling (c). Spatial variability (a) accounted only for 30 % of the total variability. Therefore, we optimised sampling effort by decreasing the number of crossriver sampling points at each station relative to replicates at each sampled point.

Samples were collected at each station in the first meter of the water column at two crossriver points, using a clean 2 l Van Doorn bottle. At each point, six liters ( $3 \times 2$  l samples) were collected and mixed in a 8 l opaque polypropylene bottle. For viral and bacterial counts, three replicates were realised on a 5 ml subsample from each opaque bottle. Analyses of bacterial activities and environmental parameters were performed on one opaque bottle per station. All water samples were stored in the dark at 4°C onboard until laboratory analysis (within 3 hours). Samples for assessing bacterial activities were kept at *in situ* temperature.

### 2.3.3. Physical and chemical parameters

River flow data were obtained daily from the Direction Régionale de l’Environnement (DIREN) of Bordeaux (France). Salinity and temperature were monitored on board with a (WTW, type LF196) conductivity meter.

Suspended solid samples were obtained by filtering between 50 and 300 ml (volume according to sample turbidity), through pre-weighted glass-fibre filters (Whatman GF/F, 0.7 µm pore size, 47 mm diam. and pre-combusted at 490°C for 2 h). Total suspended solids (TSS) corresponded to the increase in weight of filters after drying at 60°C during 12 h (Aminot 1983). Particulate mineral matter (PMM) corresponded to the weight of particles after a supplementary burning step of 2 h at 490°C. Particulate organic matter (POM) was estimated from the difference between the weight of burned and dried filters (e.g.  $POM = TSS - PMM$ ).

Water samples for dissolved inorganic nutrient concentrations (nitrate [NO<sub>3</sub>], nitrite [NO<sub>2</sub>], ammonium [NH<sub>4</sub>], urea and phosphate [PO<sub>4</sub>]) were filtered immediately through Whatman GF/F filters (47 mm diam.) and stored at -20°C until analysis with a Skalar auto-analyser as described by Strickland and Parsons (1972). Dissolved organic carbon (DOC) concentrations were estimated spectrophotometrically (Pages et Gadel 1990, Pages et al. 1997).

Samples for chlorophyll *a* (Chl *a*) and phaeopigments were obtained by filtering 25 to 500 ml onto Whatman GF/F filters (47 mm diam.). The volume of each subsample was adjusted in order to prevent loss of pigments from cell destruction due to filter plugging. Filters were frozen at -20°C until extraction, which was completed within one month. Pigments were extracted in the dark overnight with 90 % acetone at 4°C and then analysed by the fluorometric procedure on a Kontron fluorimeter, according to Yentsch and Menzel (1963).

#### 2.3.4. Viral and bacterial abundance

For viral and bacterial counts, 5 ml of water was immediately fixed on board with 0.2 µm filtered formaldehyde (final concentration 2 % v/v) and stored at 4°C until preparation at the laboratory. Virus and bacteria were enumerated using nucleic acid staining (SYBR Green I) and epifluorescence microscopy according to Noble and Fuhrman (1998). Slides were stored at -20°C until analysis, which was completed within 5 days after sample collection. For each station, six slides (three per 5 ml subsample) were realised and for each slide, at least 15 fields were selected at random. Bacteria and virus were counted using a Leica epifluorescence inverted microscope under blue excitation. Only free-living bacteria and

viruses were enumerated. At least 150 bacterial cells and 200 viruses were counted on each preparation.

### 2.3.5. Bacterial activities

We assessed two types of activities, bacterial production and ecto-proteolytic activity. Bacterial production was determined by the [<sup>3</sup>H-methyl]-Thymidine (TdR) incorporation method according to Fuhrman and Azam (1982). Control and triplicates (5 ml) were incubated for 30 to 60 min with 40 nM final concentration of [<sup>3</sup>H] TdR (50 Ci mmole<sup>-1</sup>) at *in situ* temperature. Rates of <sup>3</sup>H thymidine incorporation were transformed to cell production using a conversion factor of 2.18 10<sup>18</sup> cells produced per mole of thymidine incorporated (Fuhrman et Azam 1982).

Ecto-proteolytic activity (EPA) was assessed fluorometrically using L-leucine-7-amido-4-methylcoumarin (LLMCA) as substrate (Hoppe 1983). Control and duplicate samples (2 ml) were incubated with LLMCA (500 nM) for 0.5 to 6 h in the dark at *in situ* temperature. Sodium dodecyl sulfate was added (1 % final concentration) to stop the incubations (Delmas et Garet 1995). Samples were frozen at -20°C until analysis. Determination of the 7-amino-4-mehtylcoumarin released by the substrate hydrolysis was carried out by flow-injection analysis with fluorescence detection at 380 and 440 nm for excitation and emission, respectively (Delmas et al. 1994).

### 2.3.6. Statistical analyses

So as to test their conservative behaviour, nutrients, chlorophyll *a*, viral and bacterial abundance along the estuarine salinity gradient were tested against a linear dilution model detailed in Trousselier et al. (2002). Variation from this dilution model was tested with a Mann – Whitney test.

Due to non-normally distributed data, non-parametric ANOVA (Kruskal Wallis) with non-parametric multiple comparisons (Zar 1999) were used to test the temporal and spatial variance of the different parameters.

Seasonal variations among environmental parameters were characterised and compared by averaging the values of each parameter along the estuary for each (station A to E) sampling date. These means were computed in a principal component analysis (PCA). The

ordinates of the first two axes of the PCA were used for a hierarchical ascendant classification (HAC) (Legendre et Legendre 1998).

Spearman rank ( $r_s$ ) correlations and stepwise multiple regressions were performed to investigate the relationships between viruses and environmental parameters. Colinearities in the independent variables were tested before running stepwise multiple regressions. All variables were logarithmically transformed so as to improve the linearity, and homoscedasticity of residuals (Tabachnick et Fidell 2001).

All statistical analyses were run using the statistical software Excel Stat Pro on Microsoft Excel 97.

## 2.4. Results

### 2.4.1. Environmental dynamics

Charente River flow ranged from 30 to 108 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> during the course of the study with peak discharge in winter and minimum discharge in summer (Figure 2.2). Storms occurred during sampling in May and October 2002. The salinities over the year averaged 0.2, 3.3, 12.5, 20.7 and 32.6 PSU at stations A, B, C, D, and E, respectively (Table 2.1). At all stations, temperature followed a typical seasonal pattern with minimum in March (5.0°C) and maximum in August (23.1°C). Temperature differences along the estuary never exceeded 3.2°C (error bars, Figure 2.2).

Based on the results of the HAC, the data could be divided into three periods ( $p < 0.05$ ): a “winter season” group (comprising late fall and winter months), a “summer season” group (comprising summer and early fall months), and a transition group (May and October) situated between the two principal seasons (Figure 2.3). The presence of the April months (2002 and 2003) in each major season (Figure 2.3), indicated a high variability of environmental variables between the two years. Thus, April months were omitted from further seasonal treatment.

Table 2.1 : Annual means ( $\pm$  standard deviation) of environmental parameters from April 2002 to April 2003 for each sampling station in the Charente Estuary.

Parameters	Unity	Station A	Station B	Station C	Station D	Station E
Salinity	PSU	0.2	3.3 $\pm$ 1.4	12.5 $\pm$ 1.2	20.7 $\pm$ 3.1	32.6 $\pm$ 1.7
PO4		2.0 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 1.7	2.7 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.2
DIN	$\mu\text{mol l}^{-1}$	395 $\pm$ 95	374 $\pm$ 85	271 $\pm$ 49	194 $\pm$ 70	34 $\pm$ 25
Urea		4.1 $\pm$ 4.6	4.8 $\pm$ 3.1	3.1 $\pm$ 1.4	2.7 $\pm$ 1.4	3.2 $\pm$ 2.4
DOC	$\text{mgC l}^{-1}$	3.3 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.3
Total suspended solids	$\text{mg l}^{-1}$	79 $\pm$ 77	1654 $\pm$ 1482	512 $\pm$ 428	264 $\pm$ 353	55 $\pm$ 26
Chl <i>a</i>	$\mu\text{g l}^{-1}$	1.9 $\pm$ 2.5	5.7 $\pm$ 3.2	4.0 $\pm$ 3.3	3.8 $\pm$ 2.5	2.8 $\pm$ 2.0
Phaeopigment		5.6 $\pm$ 5.7	39.6 $\pm$ 24.5	18.8 $\pm$ 16.7	9.3 $\pm$ 8.4	3.0 $\pm$ 1.5
Virus abundance	$\times 10^7 \text{ ml}^{-1}$	9.8 $\pm$ 4.9	5.6 $\pm$ 1.8	3.9 $\pm$ 1.5	3.8 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 1.9
Bacterial abundance	$\times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$	7.2 $\pm$ 3.4	4.6 $\pm$ 2.0	3.6 $\pm$ 1.5	3.5 $\pm$ 1.4	4.0 $\pm$ 2.1
VBR		14.3 $\pm$ 4.8	13.2 $\pm$ 3.1	11.3 $\pm$ 2.6	11.8 $\pm$ 3.1	11.6 $\pm$ 3.7
Bacterial cell production	$\times 10^3 \text{ cell ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$	50 $\pm$ 66	487 $\pm$ 525	145 $\pm$ 136	80 $\pm$ 100	31 $\pm$ 48
Ecto-proteolytic activity	$\text{nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	2.7 $\pm$ 2.1	34.5 $\pm$ 36.0	15.9 $\pm$ 12.4	9.2 $\pm$ 10.1	3.1 $\pm$ 2.7

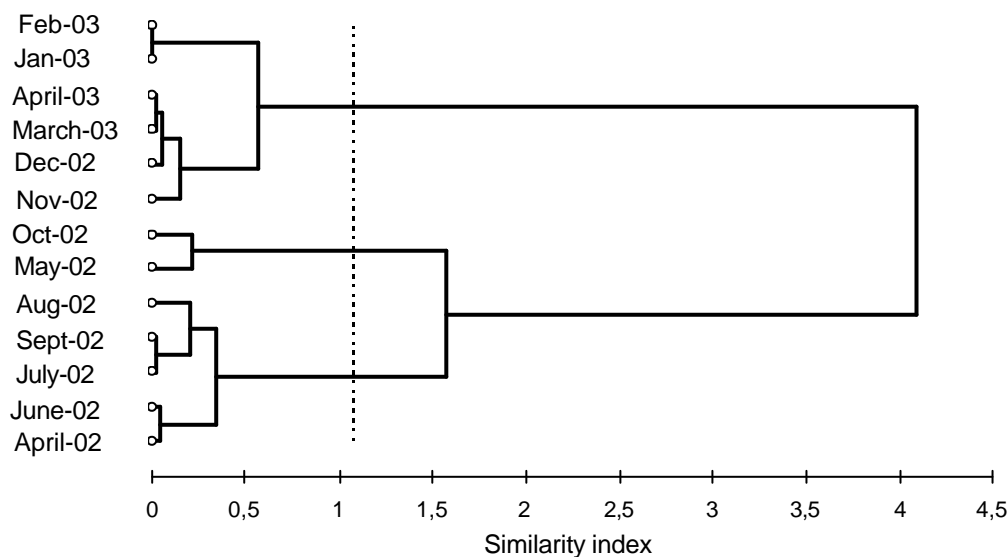


Figure 2.3 : Dendrogram based on hierarchical ascendant classification analysis (HAC) performed on environmental parameters (mineral and organic suspended solids, chlorophyll *a* (Chl *a*) and phaeopigments, virus and bacterial abundance, temperature, nutrients and river discharge). The dotted line represents the threshold above which the different groups were considered significantly different ( $p < 0.05$ ).



Over the sampling period, all inorganic nutrients as well as DOC concentrations were significantly different ( $p < 0.05$ ) among the stations.. Dissolved inorganic nitrogen (DIN =  $\text{NO}_3$  [with  $\text{NO}_3$  making up, on average, 98 % of DIN] +  $\text{NO}_2$  +  $\text{NH}_4$ ) and DOC concentrations followed a decreasing linear dilution from river to basin (Figure 2.4). By contrast, highest  $\text{PO}_4$  values were observed at station B (Table 2.1); then its concentrations followed the linear dilution model (Figure 2.4). Urea concentrations were not significantly different ( $p > 0.05$ ) among stations. For any given station, DIN and DOC concentrations were significantly higher during winter, as compared to summer ( $p < 0.05$ ), whereas  $\text{PO}_4$  concentrations displayed the inverse pattern (Figure 2.4).

TSS varied significantly ( $p < 0.05$ ) among stations with lowest concentrations found in the basin and in the river and highest values located at station B (Table 2.1, maximum recorded value =  $5.6 \text{ g l}^{-1}$  in May 2002). For any given station, no significant seasonal differences of TSS were recorded; nevertheless, at station A and B, average TSS were moderately higher in summer (Figure 2.5A).

PMM were always dominant and constituted 75 to 92 % of the TSS among all the stations. Plotting TSS against the proportion of POM at each station (Figure 2.6), permitted to distinguish one zone of very high resuspension (POM < 10 % of TSS) indicating strong vertical turbulences and shear forces (station B), one zone of high resuspension (stations C and D) and two zones of low resuspension (POM > 15 % of TSS, stations A [river] and E [basin]).

Chl *a* and phaeopigment behaved similar to  $\text{PO}_4$  and suspended solids. Their values were significantly different ( $p < 0.05$ ) among stations with highest values recorded at station B and lowest values in the river (A) and in the basin (E) (Table 2.1). From station B to E, Chl *a* values declined in a non linear fashion, but the means were not significantly different ( $p > 0.05$ ) from the linear dilution model (Figure 2.4). Seasonally, Chl *a* values as well as the Chl *a* / phaeopigment ratio were markedly higher ( $p < 0.05$ ) during summer (Figures 4 and 5B). Indeed, for any given station, the seasonal averages of Chl *a* were multiplied by 5.1, 1.3, 2.3, 4.0 and 4.5 for stations A, B, C D, and E, respectively, between winter and summer (Figure 2.4).

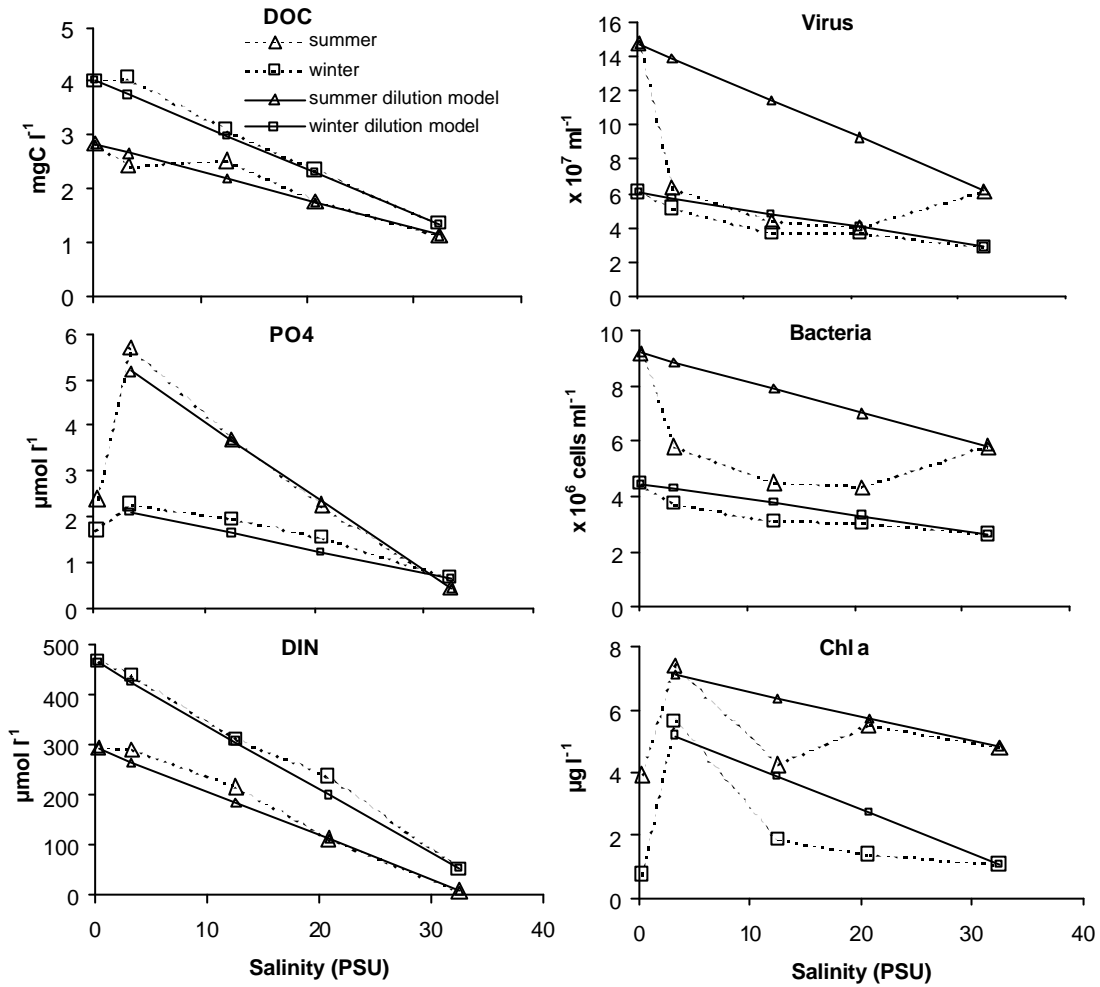


Figure 2.4 : Seasonal variations in nutrient concentrations (PO<sub>4</sub>, DOC and DIN), Chl *a* values and virus and bacterial abundances for each station (seasonal means). Full lines represent linear dilution models. For parameters influenced by resuspension (Chl *a*, PO<sub>4</sub>) the linear dilution model was calculated from station B to station E.

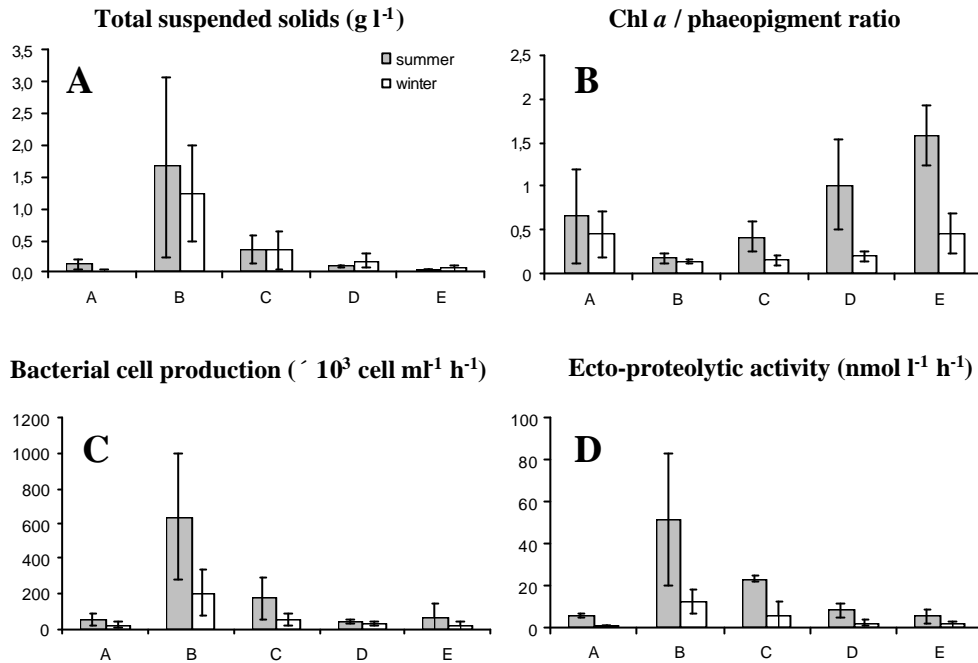


Figure 2.5: Seasonal means ( $\pm$  standard deviation) of total suspended solids (A), Chl *a* / phaeopigment ratios (B) and bacterial activities (C and D) along the estuarine salinity gradient during the course of the study.

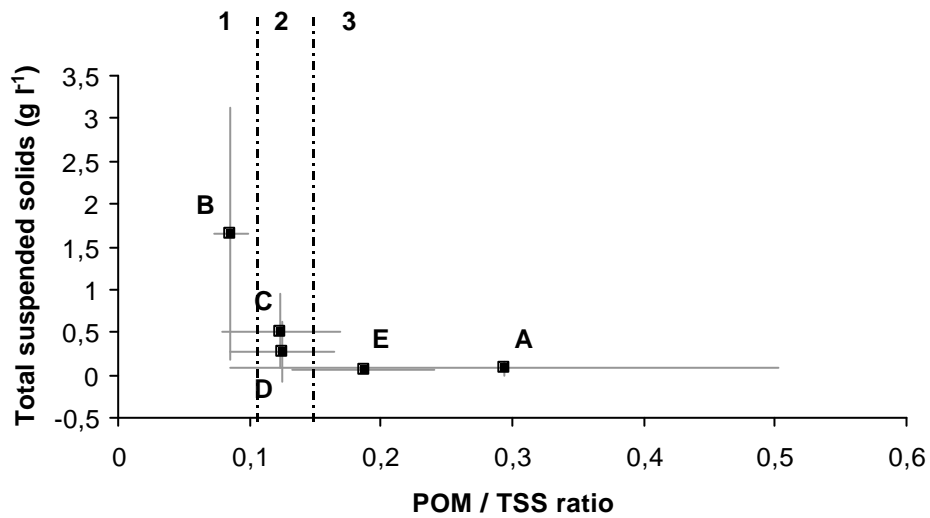


Figure 2.6: Plot of total suspended solids (TSS) against the POM / TSS ratio for each station. Year averages ( $\pm$  standard deviation) of total suspended solids and organic suspended solids were utilised. Assuming that the settling rate for POM is lower than for PMM, the dotted line (qualitatively) separates very high (1), high (2) and low resuspension areas (3).

### 2.4.2. Spatio-temporal distribution of microorganisms

Over the entire Charente Estuary, viral abundance during the study period varied nearly 15 fold (from  $1.4 \times 10^7$  to  $20.8 \times 10^7$  viruses  $\text{ml}^{-1}$ ) and bacterial abundance nearly 10 fold (from  $1.2 \times 10^6$  to  $10.7 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , Figure 2.7). The differences between stations were significant ( $p < 0.05$ ) with a decreasing trend from river (station A) to basin (station D, E) (Table 2.1). During winter both, viral and bacterial concentrations followed the linear salinity dilution line (Figure 2.4). However, during summer, the values were significantly different ( $p < 0.05$ ,  $n = 20$ ) from that line (Figure 2.4). Indeed, the most significant decline in viral and bacterial concentrations during summer (57 % and 37 % on average, respectively) occurred between the freshwater (0.2 PSU, station A) and the low salinity zones (3.3 PSU, station B). The mean virus to bacteria ratio (VBR) varied from 14.3 (station A) to 11.3 (station C) without significant differences along the estuarine salinity gradient (Table 2.1).

Temporally, viral and bacterial abundance varied significantly ( $p < 0.05$ ) between months. Maximal virus concentrations were found in August at all stations (except D), with values ranging from  $6.5 \times 10^7$  (C) to  $20.8 \times 10^7$  viruses  $\text{ml}^{-1}$  (A) (Figure 2.7). At station D, virus peaked in early winter (November). Likewise, minor early winter (November and December) peaks of virus occurred at stations B and C with concentrations of  $6.2 \times 10^7$  (C) and  $7.2 \times 10^7$  viruses  $\text{ml}^{-1}$  (B). Summer viral abundance always exceeded winter abundance, on average by 143, 22, 19, 8 and 117 % for stations A, B, C, D and E, respectively.

Bacterial temporal dynamics corresponded to dynamics of viral abundance with mean maxima observed during summer (from  $5.8 \times 10^6$  to  $10.7 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) (Figure 2.7). A second peak of bacteria occurred in October (station A) or December (all other stations) with abundance ranging from  $4.4 \times 10^6$  to  $9.0 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  (Figure 2.7). Most striking was the dramatic general decrease in bacterial and viral abundance (48.7 % and 35.9 % on average for all stations, respectively) between August and September and between December and January (- 59.7 % and - 53.8 %, respectively). As for virus, bacteria summer abundance always exceeded those of winter, on average by 107, 57, 46, 43 and 120 % for station A to E, respectively. The VBR presented a high temporal variability, ranging from 24.2 in February (station A) to 6.5 in January (station C) (Figure 2.7).

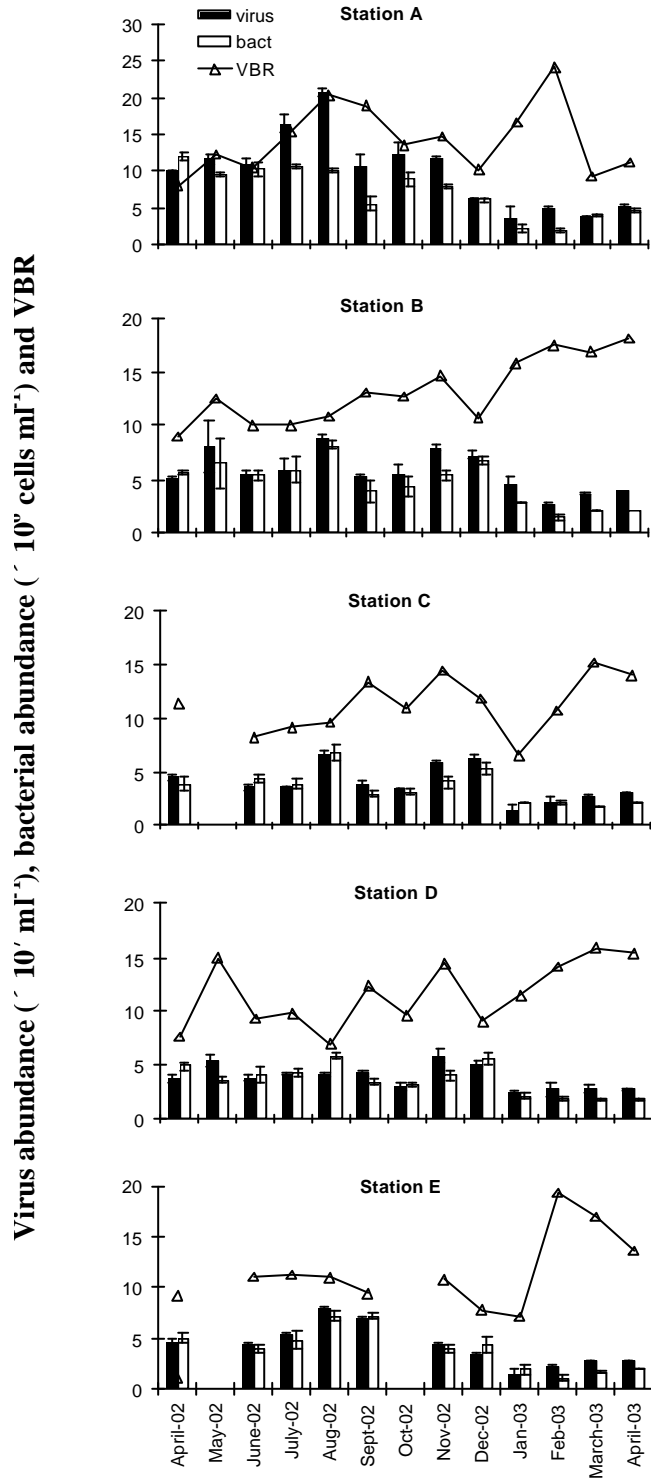


Figure 2.7: Virus and bacterial abundance and virus / bacteria ratios (VBRs) along the estuarine salinity gradient from April 2002 to April 2003. Error bars represented the standard deviations, comprising crossriver and subsampling variations, as explained in the method section. Missing values corresponded to the two major storms.

### 2.4.3. Relationships between virus and biotic / abiotic parameters

On the entire data set, viral abundance was strongly and positively correlated with bacterial abundance ( $r_s = 0.85$ ,  $n = 50$ ,  $p < 0.001$ , Table 2.2) and weaker but significantly correlated with bacterial production ( $r_s = 0.34$ ,  $p < 0.01$ , Table 2.2). Moreover, virioplankton was positively correlated with temperature ( $r_s = 0.40$ ), DOC ( $r_s = 0.35$ ), PO<sub>4</sub> ( $r_s = 0.42$ ) and negatively correlated with salinity ( $r_s = -0.45$ ). No significant correlations were found between virus and photosynthetic pigment.

Over the entire data set as well as with seasonally separated data, bacterial abundance was by far the most important predictor of viral abundance, followed by salinity (cf. Tables 3 and 4). On the other hand, neither bacterial production nor temperature contributed significantly to predicting viral abundance. Thus, bacterial abundance alone explained between 66 % (winter) and 76 % (summer) of viral variability by simple linear regression with slope coefficients of 0.8 and 1.2, respectively (Figure 2.8). In stepwise multiple regression, the contribution of salinity to the viral variability was higher in summer than in winter (Table 2.4). DIN played a minor prediction role for virus during summer only.

For the entire data set, bacterial abundance variations were best explained by temperature and nutrients (DOC and DIN, Table 2.3). Salinity became the principal predictive variable in summer, followed by organic nutrients and temperature (Table 2.4).

### 2.4.4. Bacterial activities

Bacterial cell production and EPA in the Charente Estuary displayed spatial patterns similar to PO<sub>4</sub>, photosynthetic pigments and TSS (e.g. low values in the river [station A] followed by a peak in the turbidity maximum [station B] and a decline to the basin [stations B to E]) (Figures 5C and 5D). The river and basin values were comparable for both parameters (Table 2.1). Bacterial production was 3 to 16 fold higher in the turbidity maximum compared to the other stations. EPA presented similar differences (2 to 13 fold higher in the turbidity maximum).

Both, bacterial activities were significantly higher ( $p < 0.01$ ) during the summer season compared to winter (Figures 5C and 5D). Bacterial activities were positively correlated with temperature ( $r_s = 0.50$  and  $0.64$ ), phytoplankton indicators (Chl *a* and phaeopigment) ( $r_s = 0.82$  and  $0.86$ ), TSS ( $r_s = 0.84$  and  $0.81$ ) and with PO<sub>4</sub> ( $r_s = 0.63$ ) (Table 2.2).

Table 2.2 : Simple ( $r_s$ , Spearman rank) correlation coefficients between virus, bacterial abundances and environmental parameters for the whole data set (n= 50). Only significant correlations are presented. All data were log tranformed.

	Virus	Bacteria	Temperature	Salinity	Bacterial production	Ecto-proteolytic activity	Chl <i>a</i> + Phaeopigment	Suspended solids	DOC	DIN
Bacteria	0.85***									
Temperature	0.40**	0.48***								
Salinity	- 0.45**									
Bacterial production	0.34**		0.50***	- 0.31**						
Ecto-proteolytic activity			0.64***		0.88***					
Chl <i>a</i> + Phaeopigment			0.30**		0.82***	0.86***				
TSS					0.84***	0.81***	0.94***			
DOC	0.35**		- 0.31**	- 0.81***						
DIN				- 0.84***					0.74***	
PO4	0.42**	0.38**	0.43**	- 0.49***	0.63***	0.63***	0.40**	0.59***	0.40**	0.33**

\* =  $p < 0.05$

\*\* =  $p < 0.01$

\*\*\* =  $p < 0.001$

Table 2.3 : Stepwise linear regression of viral abundance and bacterial properties versus environmental parameters. Virus abundance: VA, bacterial abundance: BA, bacterial production: BP, ecto-proteolytic activity: EPA, temperature: TEMP, salinity: SAL, Chl *a* and phaeopigment concentrations: Chl *a* + Pheo, dissolved inorganic nitrogen: DIN, dissolved organic carbon: DOC and suspended solid concentrations: TSS. The multiple regression was applied to the whole data set (n = 50).  $R^2$  was the determination coefficient adjusted to the number of variable in the regression.

Multiple regression equations	Adjust $R^2$	n
$\log VA = 0.73***\log BA - 0.08***\log SAL + 2.90***$	0.79	50
$\log BA = 0.79***\log TEMP + 0.85***\log DOC - 0.21**\log DIN + 5.84***$	0.55	50
$\log BP = 0.69***\log TSS + 1.17***\log TEMP + 0.58*$	0.77	50
$\log EPA = 0.92***\log (Chl\ a + Pheo) + 1.26***\log TEMP - 1.58***$	0.87	50

$p < 0.0001 = ***$ ;  $p < 0.01 = **$ ;  $p < 0.05 = *$

Table 2.4 : Seasonal stepwise linear regression of viral abundance and bacterial properties versus environmental parameters. Virus abundance: VA, bacterial abundance: BA, bacterial production: BP, ecto-proteolytic activity: EPA, temperature: TEMP, salinity: SAL, Chl *a* and phaeopigment concentrations: Chl *a* + Pheo, dissolved inorganic nitrogen: DIN, dissolved organic carbon: DOC and suspended solid concentrations: TSS. R<sup>2</sup> was the determination coefficient adjusted to the number of variable in the regression..

Season	Multiple regression equations	Adjust R <sup>2</sup>	n
Summer	$\log VA = 0.63^{***}\log BA - 0.22^{***}\log SAL - 0.11^{**}\log DIN + 3.96^{***}$	0.95	18
Winter	$\log VA = 0.70^{***}\log BA - 0.07^{*}\log SAL + 3.08^{***}$	0.70	24
Summer	$\log BA = -0.17^{**}\log SAL - 0.76^{**}\log DOC - 2.15^{*}\log TEMP + 4.27^{**}$	0.60	18
Winter	$\log BA = 1.14^{***}\log TEMP + 0.92^{**}\log DOC + 6.61^{***}$	0.57	24
Summer	$\log BP = 1.24^{***}\log TSS + 0.83^{***}\log DIN + 0.36^{***}\log SAL - 1.15^{**}\log PO4 + 1.13^{**}$	0.95	18
Winter	$\log BP = 1.00^{***}\log (Chl\ a + Pheo) + 1.67^{***}\log TEMP - 0.20^{***}\log SAL - 1.29^{***}$	0.93	24
Summer	$\log EPA = 0.72^{***}\log TSS + 0.18^{*}\log SAL - 2.00$	0.79	18
Winter	$\log EPA = 0.89^{***}\log (Chl\ a + Pheo) - 0.40^{***}$	0.83	24

p < 0.0001 = \*\*\*; p < 0.01 = \*\*; p < 0.05 = \*



Variations in bacterial production and EPA were best explained by Chl *a* + phaeopigment (primarily in winter; Table 2.4) and suspended solids (primarily in summer, Table 2.4) with an additional contribution of temperature (winter and entire year, Tables 3 and 4). The most consistent influence of salinity occurred during summer (Table 2.4).

## 2.5. Discussion

### 2.5.1. Microbial abundance along the estuary

Microbial abundance observed in the Charente Estuary ( $\approx 10^6$  bacteria and  $10^7$  viruses  $\text{ml}^{-1}$ ) were in agreement with previously published values for estuarine and coastal temperate waters (Schultz et Ducklow 2000, Wommack et Colwell 2000, Almeida et al. 2001a). Likewise, a strong correlation was found between viral and bacterial abundance as reported in a majority of other studies (Wommack et Colwell 2000 and references therein, Hewson et al. 2001, Corinaldesi et al. 2003); taken together ( $R^2 = 0.72$ ), or separated by season ( $R^2_{\text{winter}} = 0.66$  or  $R^2_{\text{summer}} = 0.76$ ), our results confirmed that bacterial abundance was a good predictor variable for virus in the Charente Estuary.

The VBR observed in this study (6.5 to 24.2) fell in the range of values recorded for estuarine waters by Wommack and Colwell (2000). It is assumed that more virus are produced when conditions favour high host growth and production rates (Cochlan et al. 1993). Previous studies noticed a decrease in the VBR with decreasing trophic status (Maranger et Bird 1995, Hewson et al. 2001) or with increasing salinity (Jiang et Paul 1994). In our study, although bacterial production and viral abundance were negatively correlated with salinity (Table 2.2), we detected no significant difference in VBRs along the estuary. This is consistent with the strong correlation found between viral and bacterial abundance (Table 2.2).

In addition, the positive correlation between viral abundance and bacterial production (Table 2.2) confirm the common assumption that high viral abundance is dependent of an active bacterioplankton host population (Heldal et Bratbak 1991, Maranger et Bird 1995). As in many estuaries (Palumbo et Ferguson 1978, Kirchman et Hoch 1988), the Charente Estuary displayed higher bacterial cell production (from  $68 \times 10^6$  to  $1862 \times 10^6$  cells  $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) in mid estuary at low salinity (3.3 PSU) corresponding to the turbidity maximum, followed by a decrease seaward. If the widely used conversion factor of 20 fg C cell<sup>-1</sup> is applied to our cell

production data (Lee et Fuhrman 1987), the highest bacterial production rates reached  $895 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ day}^{-1}$  at station B, which is of the same order than maximum rates reported in the Ubadai estuary ( $694 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) and in the Loire estuary ( $803 \mu\text{g C l}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) (Revilla et al. 2000). Nevertheless, the absence of correlation between bacterial activities and bacterial abundance might be explained by the fact that only free bacteria were counted in epifluorescence microscopy, while our experimental protocols to assess bacterial activities also included attached planktonic and resuspended benthic bacteria.

No correlation was found between viral abundance and Chl *a*. The importance of the scale of the study and the weakness of Chl *a* as predictor of phytoplankton cell concentration have already been proposed as hypothesis explaining the lack of relation between viral abundance and Chl *a* (Cochlan et al. 1993, Wommack et Colwell 2000). Furthermore, the low values of Chl *a* observed during the study may result in low phytophage production. In conclusion, our results agree with the common hypothesis that bacteria are the major host population for virus in aquatic environments.

### 2.5.2. Temporal dynamics: influence of temperature

As previous studies (Bergh et al. 1989, Jiang et Paul 1994, Weinbauer et al. 1995, Cochran et Paul 1998), we recorded significant seasonal change in virioplankton abundance related to temperature, with higher viral concentrations during summer and lower concentrations during winter (especially at the head and mouth of the estuary). This was affirmed by the positive correlation (Table 2.2) between viral abundance and temperature.

Nonetheless, viruses were not responding to temperature themselves but to a number of factors related to temperature, notably bacterial abundance. Indeed, the slope of the regression viral versus bacterial abundance was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in summer indicating a faster, probably temperature-induced response of viral abundance to increasing bacterial abundance or a higher burst size at higher temperature (Figure 2.8). Finally, maxima of bacterial abundance in the estuary occurred in summer, further contributing to the trend of higher viral concentrations found during that season.

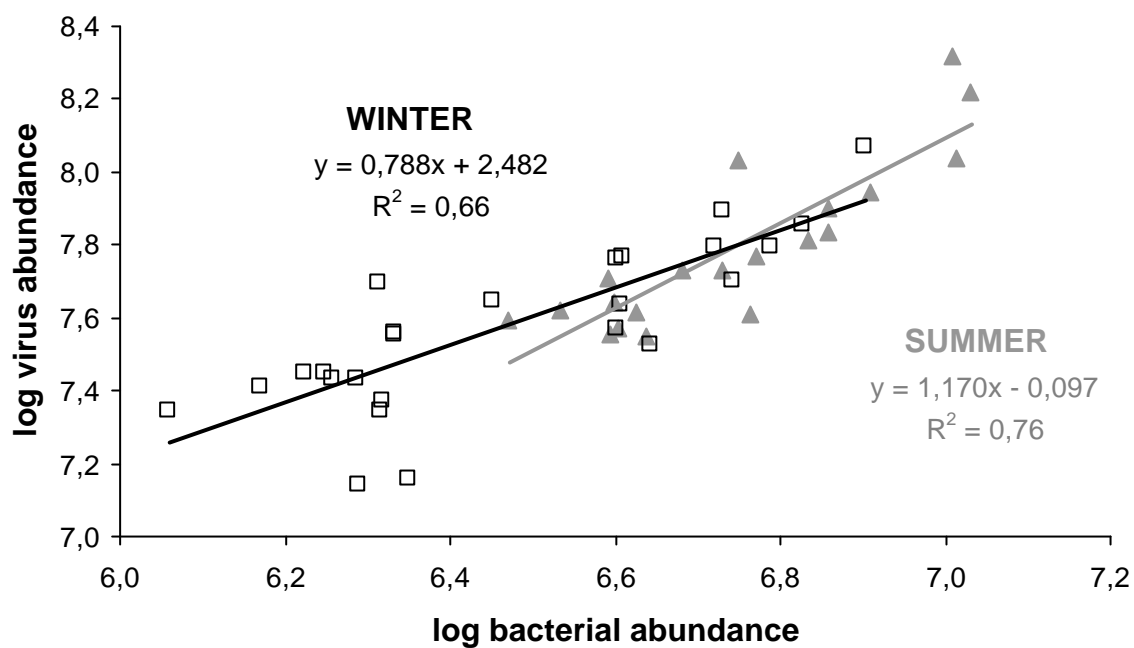


Figure 2.8: Winter (from November 2002 to March 2003, square;  $n = 22$ ) and Summer (from June 2002 to September 2002, triangle,  $n = 18$ ) simple linear regressions between virioplankton and bacterioplankton in the Charente Estuary. The slope of the two regressions was significantly different (t test for slope comparison,  $p < 0.05$ ).

Many studies have reported a strong influence of temperature on bacterial properties in estuarine (Ducklow et Shiah 1993, Shiah et Ducklow 1994), freshwater (Lovell et Konopka 1985, White et al. 1991) and coastal environments (Kirchman et al. 1993). Bott (1975) first, then Ducklow and Shiah (1993) showed that temperature, rather than substrate supply, limits bacterial growth rate in aquatic ecosystems. In the Charente Estuary, bacterial abundance and activities were strongly and positively correlated with *in situ* temperature (Table 2.2). Moreover, temperature was the primary factor predicting bacterial abundance (Table 2.3). Despite a significant relation between bacterial activities and temperature, the latter was less involved in the explanation of bacterial production and EPA (Table 2.3). We hypothesise that the influence of temperature on bacterial activities was biased by the inclusion of resuspended attached benthic bacteria in the assay protocols.

Shiah and Ducklow (1994) proposed that below 20°C and without substrate limitation, bacterial growth rate is limited by temperature. On the other hand, when temperature exceeds 20°C, this limitation is removed, allowing fast growing bacterial populations, inducing in turn a substrate limitation. Results from our seasonal analysis (Table 2.4) support their hypothesis. During the winter season (mean temperature = 9.4 °C), temperature played an important role in the explanation of bacterial abundance and production whereas in summer (mean temperature = 20.7 °C), the effect of salinity and nutrients (DOC, DIN and PO<sub>4</sub>) overrode the effect of temperature (Table 2.4). Nevertheless, the conservative pattern of nutrient concentrations along the estuary and their high concentrations excluded the possibility of bacterial nutrient limitation during summer.

Although temperature was a major environmental factor explaining the temporal variability of viral and bacterial properties, their spatial variability was unlikely explained by temperature because the difference of temperature never exceeded 3.2 °C along the estuary, as opposed to seasonal variations exceeding 15 °C.

### 2.5.3. Spatial dynamics: influence of water mixing and river discharge

After bacterial abundance, salinity was the second most important factor related to viral abundance (Tables 2, 3 and 4). Microbial distributions along the estuary tended to decrease parallel with increasing salinity. The negative correlation as well as partial regression coefficients (Table 2.3) between viral abundance and salinity corroborate results reported by Jiang and Paul (1994) and Hewson et al (2001). Two alternative hypotheses may

explain this negative relation: a gradual dilution of virus entering the estuary from the river, or an alteration of viral integrity due to salinity and/or other factors. Our seasonal analysis suggests that the first hypothesis prevailed during winter: microbial abundance followed the linear dilution model (Figure 2.4). Thus, during winter, river discharge exceeded net growth rates (production minus removal processes) of virus and bacteria preventing their accumulation in the estuary.

Conversely, during the summer season, viral abundance differed significantly from the values of the linear dilution model (Figure 2.4), showing a significant decline at the head of the estuary (between stations A and B) followed by an upswing toward the mouth. This divergence was likely related to three phenomena.

First, the stepwise regressions on summer data showed that viral variability was best explained by bacterial abundance, followed by salinity and DIN. Now, bacterial summer abundance presented the same marked decline at the head and upswing toward the mouth of the estuary. As a result, it is likely that the decline and upswing of viral abundance was a consequence of the change of their major host (bacteria) populations in the estuary. The balance between net growth rate and local dilution rates might be part of the explanation of this pattern. In summer, the increase of temperature stimulated bacterial production whereas river discharge was divided by two. In addition, the river station due to the presence of a dam and the basin station may present longer residence time than in mid-estuary stations. Lastly, the relatively higher Chl *a* / phaeopigment ratio observed in summer at stations A and E (Figure 2.5B), indicate more viable phytoplankton communities that might have contributed to the higher microbial (viruses and bacteria) abundance. Thus, we suggested that net growth rate exceeded local dilution rates at station A and E allowing accumulation of bacteria.

Furthermore, the high suspended solids and photosynthetic pigment concentration in mid-estuary stations in summer could favour the attachment of bacteria to particles, preventing their detection by the counting protocol. Biological factors such as predation or physiological stress may complete the explanation of this seasonal bacterial loss.

Second, the dramatic decrease in viral abundance between the two upstream stations was twice as important as the decrease of bacteria, while the seaward upswing were similar for virus and bacteria. Viruses are known to sorb actively on suspended matter present in the water column (Proctor et Fuhrman 1991, Suttle et Chen 1992, Maranger et Bird 1996). In our study, suspended solids were multiplied by 20 between stations A and B and their mean

concentrations were higher during the summer season. Therefore, higher adsorption rates during the summer season might result in supplementary viral loss between stations A and B by apparent free-virus disappearance. However, further studies on this subject are needed since the high variability of TSS at station B precludes a definitive confirmation of this hypothesis.

#### 2.5.4. Nutrient bioavailability and viral loop

As viral infection is a specific bacterial density dependent process, nutrient availability could influence viral dynamics by controlling bacterial abundance, diversity and cell activity. Previous studies showed that a depletion of nutrients in the environment, by limiting bacterial growth, could affect both the burst size and the latent period (Stent 1963). However, in the Charente Estuary, our results indicate that nutrients were unlikely to limit bacterial activities during the course of the study. First, from our environmental monitoring, PO<sub>4</sub>, DIN, NH<sub>4</sub> (2.49 +/- 1.66  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , results not shown), urea and DOC concentrations never reached limiting values. Similarly, organic substrates such as dissolved free amino acids (DFAA) and dissolved free monomeric carbohydrates (MCHO) were not limiting since their mean concentrations remained high (385 +/- 339  $\text{nmol l}^{-1}$  and 3.36 +/- 1.59  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) never decreasing below 33  $\text{nmol l}^{-1}$  and 0.60  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , respectively (data not shown). Second, a regression of log (bacterial abundance) on log (bacterial production) for the whole study showed a weak relation between these variables (slope = 0.11, R<sup>2</sup> = 0.10, n = 50, p = 0.03) suggesting that bacterial abundance was not controlled by bottom up forces (e.g. resource supply) but mainly by top down processes (Billen et al. 1990, Ducklow et Carlson 1992). Lastly, DOC and DIN along the entire estuary, and PO<sub>4</sub> from station B to E, displayed a conservative pattern along the salinity gradient suggesting low biological consumption or production rates compared to control by hydrodynamic processes.

Implication of viruses in recycling of nutrients has been proposed (Fuhrman 1999, Wilhelm et Suttle 1999). In particular in P-limited conditions, increase in viral abundance caused an increase of alkaline phosphatase activity (Middelboe et al. 1996). However, in our study, we found no correlation between viral abundance and alkaline phosphatase activity (data not shown). Hence, the positive correlation between PO<sub>4</sub> concentrations and viral abundance and the significant relation between DIN and viral abundance during summer may be an artefact due to the co-variation of the nutrients with salinity.

Viruses are the most abundant component among plankton microorganisms in surface waters of the Charente Estuary. Their dynamics are shaped by complex interaction between a set of environmental and biological parameters: temporal variability in virioplankton abundance reflected the indirect influence of temperature through the control of bacterial dynamics, whereas spatial variability reflected the effect of hydrodynamic processes such as water mixing, particle resuspension and river discharge. Nutrients appeared to play a minor role. Identification of parameters influencing viral dynamics could not be complete without the consideration of top down controls such as grazing by flagellates and a better understanding of mixing processes within the estuary. Moreover, comprehension of the viral flux and behaviour along the salinity gradient will lie beyond this total community study and will require the inclusion of population analyses via viral and bacterial diversities.

### 3. Structure of virioplankton in the Charente Estuary (France): transmission electron microscopy versus pulsed field gel electrophoresis

From the paper submitted to *Microbial Ecology* (Auguet J-C, Montanié H, Lebaron P)

#### 3.1. Abstract

Changes in the composition of viral communities were investigated along a salinity gradient and at different times by means of transmission electron microscopy (TEM) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Samples were collected in fresh- (Charente River), estuarine (Charente Estuary) and coastal (Pertuis d'Antioche, French Atlantic coast) waters. Both methods revealed similar patterns in viral community structure with a dominance of small viral particles (capsid and genome size). Viruses with a head size below 65 nm made up  $71 \pm 5$  % of total virus like particles (VLP) and virus like genomes (VLG) below 100 kb accounted for  $89 \pm 9$  % of total VLG. Despite this apparent stability of virioplankton composition over spatial scale (salinity gradient), the higher proportion of large viruses (capsid and genome size) in estuarine and seawater samples indicated the presence of viral populations specific to a geographical location.

Temporal changes in the structure (capsid and genome size) of viral communities were more pronounced than those reported at the spatial scale. From January to May 2003, seasonal changes in viral abundance and bacterial production were concomitant with an increase in viral genomic diversity (richness) suggesting that virioplankton composition was strongly linked to changes in microbial activity and/or in the structure of the host communities.

Although PFGE and TEM yielded complementary results in the description of virioplankton structures, the use of PFGE alone should be enough for the monitoring of community changes.



## 3.2. Introduction

Viruses are very abundant in marine plankton, typically  $10^7$  ml<sup>-1</sup>, or about 10 times the abundance of marine bacteria. They infect bacteria, cyanobacteria, and protists, although it appears that most of the viruses present in aquatic ecosystems infect bacteria (Wommack et al. 1992, Maranger et Bird 1995). Although our knowledge on the importance and ecological role of viruses in these ecosystems has improved in recent years, we still know little on the dynamic of viruses, how their abundance vary with time and space and which factors regulate these variations. Direct counting method such as electron microscopy (EM), flow cytometry (FCM) and transmission electron microscopy (TEM) have demonstrated that virioplankton abundance vary with time (from minutes to months, (Weinbauer 2004) and references therein) and with physico-chemical factors (salinity, nutrient gradients...) (Cochlan et al. 1993, Weinbauer et al. 1993, Maranger et Bird 1995, Hewson et al. 2001).

There is relatively little experimental evidence regarding viral control of species compositions. Assuming that viruses are density-dependent and generally species- or genus-specific, and considering that they are able to infect most microorganisms living in waters, their diversity should be important and at least similar to that of bacterial communities. Therefore, viruses should strongly influence the structure of co-occurring host communities. However, we know little on this diversity of viruses probably because we do not have enough background on their genome composition. There are no available molecular markers that are shared among all viruses such as 16S rRNA genes that have permitted breakthroughs in the analysis of bacterial diversity (Hendrix et al. 1999). Only genes belonging to specific groups of viruses could be targeted by PCR based methods. For example, PCR amplification of DNA polymerase (*pol*) and RNA polymerase (RdRp) genes revealed the high diversity of DNA algal viruses and picorna-like viruses, respectively (Chen et al. 1996, Culley et al. 2003). Similarly, diversity of cyanophage was investigated through amplification of the gene of the g20 capsid protein (Zhong et al. 2002). Recently, a shotgun cloning and sequencing strategy was developed to sequence the metagenome of an uncultured marine viral community (Breitbart et al. 2002) and should provide new insights in the use of molecular markers to assess viral diversity.

As an approximation, the diversity of viruses is generally assessed by determining their genome size and some morphological features and changes in the diversity of viral communities are much less documented. The pulse field gel electrophoresis (PFGE) method

that was initially applied to the detection of different populations (genotypes) of ruminal bacteriophages based on their genome size (Klieve et Swain 1993) is actually more and more used in viral ecology. Typically, a conservative number of 7 to 35 viral genotypes with a dominance of < 100 kb genomes are observed when this whole genome fingerprinting method is applied to estuarine and marine systems (Wommack et al. 1999, Steward et al. 2000, Larsen et al. 2001, Fuhrman et al. 2002, Riemann et Middelboe 2002, Weinbauer 2004). Surprisingly, this approach has rarely been applied to examine the structure of virioplankton communities in freshwater ecosystems. When applied to marine waters, spatial and temporal changes in the virioplankton structure (VS) are generally assumed to reflect changes in environmental parameters (temperature, salinity, nutrient availability...) driving the composition of co-occurring host community (Wommack et al. 1999). In contrast, several studies revealed a stability of VS over marked physico-chemical changes (Riemann et al. 2000) and a wide range of seawater habitats (Steward et al. 2000). This may be due to some limit in the discrimination power and resolution of PFGE in detecting minor changes in the composition of virioplankton community.

Despite an increasing use of PFGE, TEM is still commonly used in viral ecology. TEM was historically the first and most common technique assessing viral diversity by providing morphological features used in the classification of viruses. On the basis of tail and head structure, 39 morphologically different bacteriophages were described in Lake Plußsee with a varying number of morphotypes over time (Demuth et al. 1993). Similarly, the capsid size classification revealed that the majority of virus in natural assemblages is in the size range of 30 – 60 nm (Wommack et Colwell 2000 and references therein), and that the frequency distribution of capsid size vary with time and locations (Børsheim et al. 1990, Cochlan et al. 1993).

In the absence of alternative methods, PFGE and TEM are still valid methods to investigate the composition and dynamic of virioplankton communities. However, these methods were never compared for this purpose and the comparison of results from the literature is generally difficult. The aim of this work was to compare these two methods and to investigate changes in the structure of virioplankton along a salinity gradient.

### 3.3. Materials and methods

#### 3.3.1. Sample collection

Samples were collected at four different stations located along a salinity gradient in the Charente estuary on the French Atlantic coast (45° 59' 06"N): (1) in the Charente river 50 km upstream from the mouth of the Charente estuary (0.2 PSU, station A), (2) in the inner estuary (20 – 24 PSU, station D), (3) at the mouth of the estuary (> 30 PSU, station E) and (4) in the Pertuis d'Antioche (> 33 PSU, station Oc, Figure 3.1). Samples were collected monthly in the first meter of water column and at the ebb cycle of spring tide (for details on sampling see in Auguet et al. in press). Analysis of VLP structure was performed from May 2002 to June 2003 at station A, E and Oc whereas analysis of VLG structure was performed from December 2002 to June 2003 at station A, D, E and Oc. All water samples were fixed immediately after collection (except PFGE samples) with 0.2 µm filtered formaldehyde (2 % final concentration) and stored at 4°C until analysis. All analyses were performed within 5 days after sample collection.

#### 3.3.2. Virioplankton concentration

To eliminate the high amount of suspended solids present in estuarine samples as well as bacteria and other microorganisms, different purification steps were applied.

For TEM, 6 tubes (37 ml capacity each) were filled with 36.5 ml for each sample and centrifuged for 30 min at 4900g (4°C, LE 70 Beckman ultracentrifuge, SW 28.1 rotor) to remove the largest particles. Then, viral particles were concentrated by ultracentrifugation according to Montanié et al. (2002) and conserved in 100 µl of TN buffer (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4) at 4°C until preparation of grids.

For PFGE analysis, 5 l samples were prefiltered through a succession of strainers (nylon fibers, Saratofil) with porosities ranging from 250 to 25-µm pore size and decanted overnight at 4°C in 8 l opaque Nalgene bottles. Then, samples were filtered using two successive barriers (1.2 and 0.2 µm pore size filters, 142 mm diameter, Sartorius). After this step, viruses from 5 l of the filtrate were concentrated by tangential ultrafiltration (Ultraslice support, 30 Kda cut-off, polysulfon membrane, Sartorius) to a volume of approximately 150 ml resulting in a concentration factor of  $7.4 \pm 0.5$ . Then the retentate was ultracentrifuged for 3 h 30 at 150000g (4°C, SW 28.1 rotor, LE 70 Beckman).

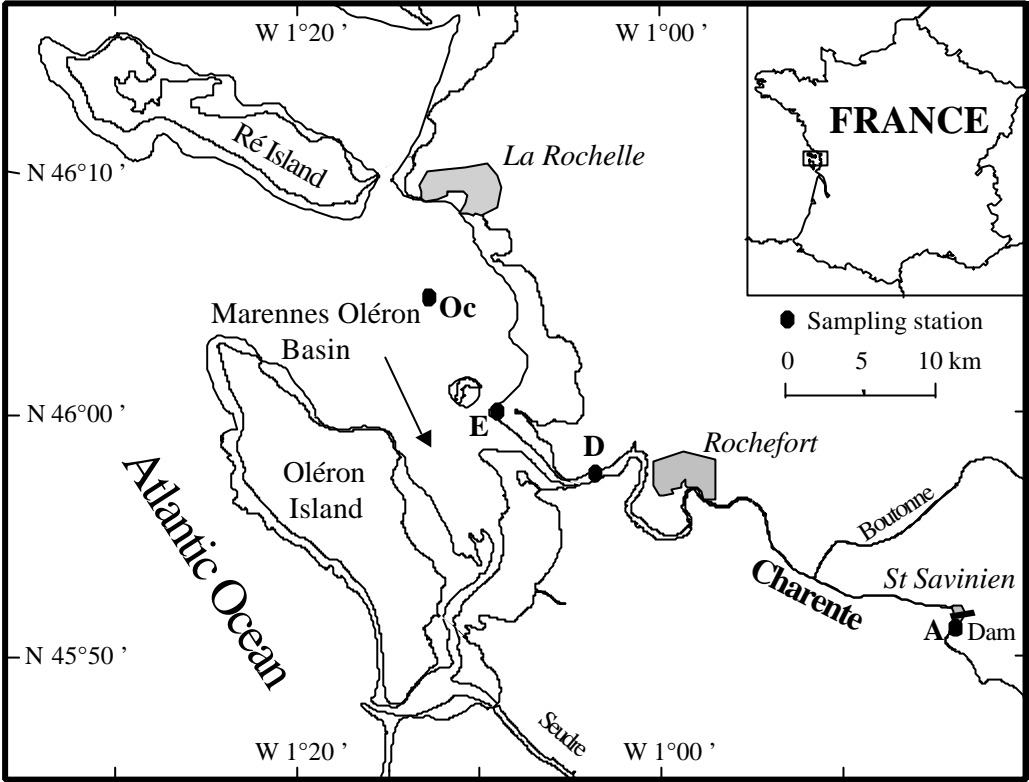


Figure 3.1: Location of sampling stations.

Viruses were resuspended and incubated overnight at 4°C in 80 µl of SM buffer (0.1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris-HCl, 0.005% (w/v) glycerol). The recovery efficiency was 50 ± 6 % of viral particles in the concentrate. Plug moulds (40µl) were prepared by mixing equal volume of virioplankton concentrate and 1.5 % of molten agarose (Bio-Rad) (Wommack et al. 1999). An equal amount of approximately 2 x 10<sup>9</sup> viruses was dispensed in each plug. Solidified plugs were punched out from the moulds into 500 µl of a Proteinase K digestion buffer (250 µl EDTA, 1 % SDS, 1 mg ml<sup>-1</sup> Proteinase K) and incubated in the dark at 30°C overnight. After removal of the digestion buffer, plugs were washed 3 times for 30 min each with TE buffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 8,0) and stored at 4°C in TE 20:50 buffer (20 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0).

### 3.3.3. Morphology (shape and size) and abundance of the VLP

The shape and size diversity of VLP was analysed by TEM. Grids were prepared by negative staining using phosphotungstate (pH 7) and according to Montanié et al. (2002). Observations were made with a Jeol JEM 2011 transmission electron microscope operating at 200 kV and calibrated with graphite grids. Two grids were observed per sample and at least 15 pictures were taken at a magnification of 50000x in order to count at least 100 VLP on each grid.

For shape classification of tailed viruses, four morphotypes were distinguished. Tailed VLP with isometric heads and long noncontractile tails were considered as siphovirus like particles (morphotype B1). Morphotype B2 regrouped siphovirus like particles with prolate heads. Tailed viruses with isometric heads and contractile tails (presence of a neck) were considered as myovirus like particles (morphotype A1). Lastly, tailed viruses classified as podovirus like particles (morphotype C1) carried isometric heads and short tails.

For capsid size classification, total and tailed viruses were categorised into 6 capsid size-classes: 20 – 44, 45 – 64, 65 – 84, 85 – 104, 105 – 124 and > 125 nm. Abundance of VLP in each size-class was calculated by applying the proportion found by TEM to the abundance of total VLP.

Virioplankton abundance (total VLP) was determined using nucleic acid staining (SYBR Green I) and epifluorescence microscopy (EM) according to Noble and Fuhrman (1998). After filtration of fixed samples (5 ml, two replicates per sample) through a 0.02 µm pore size Anodisc membrane filter (Whatman, 25 mm diameter) and staining, membranes

were mounted onto glass slides and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. VLP abundance was estimated by counting on a Leica epifluorescence inverted microscope under blue excitation. Six slides (three for each replicate) were counted per sample and at least 200 viruses were counted on each membrane.

The independence of morphotypes and the frequency distribution of viral capsid size among time and space was tested using the chi-square analysis of contingency tables (Zar 1999). Comparison of the VLP community structure between stations was achieved by computing the relative abundance of each size-class of VLP in a factorial correspondence analysis (FCA). To visualize trends on the FCA ordination plot, a clustering analysis of all samples was done using a hierarchical ascendant classification (HAC, Ward method, Excel Stat Pro software) applied to the coordinates of the samples on the first two axes of the FCA.

#### 3.3.4. Structure analysis of VLG

PFGE was performed with a GenePath system (Bio-Rad) modified with the Open Channel program (ver. 2.0, Bio-Rad) allowing creation of customised PFGE programs. Plugs containing phage lambda concatemers (Bio-Rad) or a 8 – 48 kb ladder (Bio-Rad) were used as molecular weight markers. Virioplankton and molecular weight marker plugs were placed into wells of a 1 % agarose gel (Bio-Rad) with an overlay of 1.5 % molten agarose (30  $\mu\text{l}$  for each well) and run in  $0.5 \times \text{TBE}$  gel buffer at  $14^{\circ}\text{C}$ ,  $6 \text{ V cm}^{-1}$  and a  $120^{\circ}$  angle for 15 h. Optimal migration conditions were achieved with a combination of three consecutive program blocks (“Multiple Time Blocks”) characterised by different switch times: 10 – 20 s for 1 h, 1 – 5 s for 12 h and 0.1 – 2 s for 2 h. Gels were stained with ethidium bromide ( $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$  final concentration, Bio-Rad) for 20 min and destained for the same time in MilliQ water (Millipore). With ethidium bromide, the detection limit was as low as  $10^7$  virus band $^{-1}$ . Considering a concentration factor of 1400 (ultrafiltration + ultracentrifugation) of viral particles, only viral populations up to  $8 \times 10^5$  viruses  $\text{ml}^{-1}$  in original water sample were detected on PFGE gels.

After staining, gels were digitally scanned using a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad) and quantitative analysis of digital gel pictures (molecular weight and fluorescence intensity of bands) were performed using the Diversity Database software (Bio-Rad). Molecular weight of each band was assessed by comparing its migration distance relative to DNA size standards.

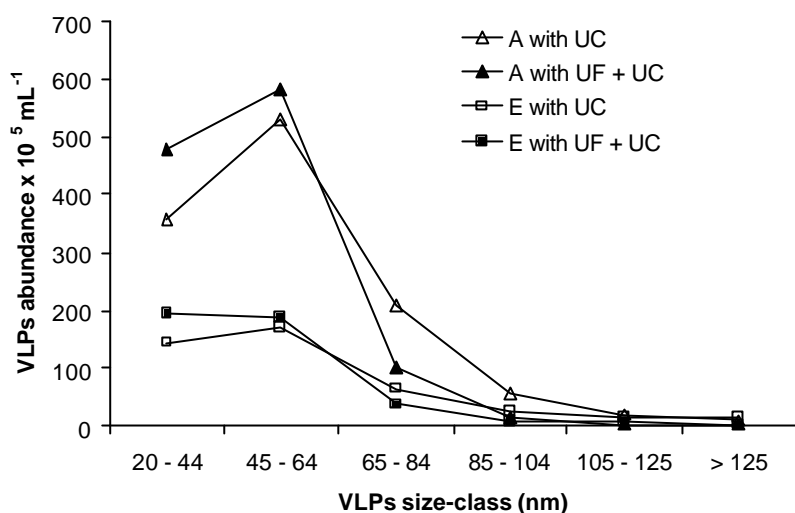


Figure 3.2: Capsid size-class distribution of virioplankton at stations A and E (November 2003) after concentration by ultracentrifugation (UC) or by ultrafiltration + ultracentrifugation (UF + UC).

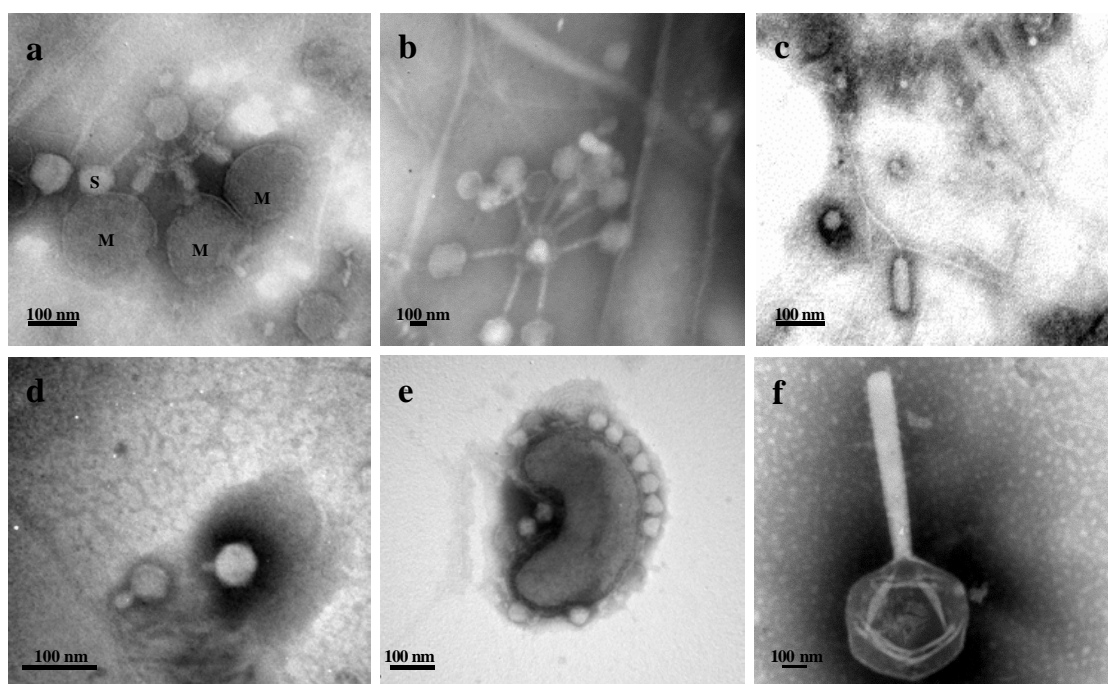


Figure 3.3: TEM micrographs of VLP from the Charente Estuary and the Pertuis d'Antioche. (a) siphovirus-like particle (S) and a group of myovirus-like particles (M); (b) group of siphovirus-like particles (morphotype B1); (c) siphovirus-like particle with prolate head (morphotype B2); (d) podovirus-like particles; (e) untailed VLP surrounding a bacteria; (f) giant siphovirus-like particle (1,495 nm).



Genome copy number was determined by calculating the integrated fluorescence intensity / molecular weight ratio for each band. To facilitate comparison among samples, the copy number present in one band was divided by the total copy number present in the same sample according to Steward et al. (2000).

Electrophoretic profiles were compared using a similarity analysis based on the presence / absence of each band within each sample. The similarity matrix (Dice coefficient) permitted the construction of a dendrogram following the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA).

## 3.4. Results

### 3.4.1. Methodological consideration

To evaluate the potential effect of both the 0.2  $\mu\text{m}$  filtration and ultrafiltration steps on the morphological structure of virioplankton, we analysed the virioplankton structure of two samples from stations A (Charente River) and E (mouth of the estuary) in November 2002 with or without 0.2  $\mu\text{m}$  filtration and ultrafiltration. When the pre-treatment was applied, abundance in each size-class correlated well with those obtained when the concentration of viruses was only performed by ultracentrifugation ( $r_s = 0.94$  and  $0.93$  for station A and E respectively,  $p < 0.01$ , Figure 3.2). Differences between treatments were not significantly different ( $p > 0.05$  as determined using a Mann – Whitney test).

### 3.4.2. Morphological structure of the virioplankton

Viral particles of the Charente estuary displayed a high variability in both size and shape (Figure 3.3). Most of the VLP were untailed (Table 3.1). For the three stations, on the basis of head and tail structures, the great majority of tailed viruses were assigned to morphotype B1 (family *Siphoviridae*, Table 3.1). Tailed viruses belonging to morphotypes A1 (family *Myoviridae*), B2 (family *Syphoviridae* with prolate heads) and C1 (*Podoviridae*) made up only 15, 13 and 8% of tailed viruses at station A, E and Oc, respectively. No significant difference ( $p < 0.05$ ) in the temporal and spatial distribution of VLP morphotypes was observed (data not shown). Total VLP abundance at stations A and E displayed the same seasonal distribution with higher abundance in August 2002 ( $20.8 \times 10^7$  and  $8.0 \times 10^7$  virus  $\text{mL}^{-1}$  at stations A and E, respectively, Figure 3.4).



Table 3.1 : Mean distribution of viral descriptors in the Charente estuary and the Pertuis d'Antioche.

		Stations			
		A	D	E	Oc
% VLP	Untailed	91 ± 5		93 ± 4	91 ± 4
	Tailed	9 ± 5		7 ± 4	9 ± 4
Morphotypes	% A1	10 ± 4		10 ± 6	6 ± 5
	% B1	85 ± 7		87 ± 8	92 ± 8
	% B2	2 ± 3		2 ± 3	/
	% C1	3 ± 4		1 ± 3	2 ± 3
	Total (n)	585		186	120
Mean capsid size (nm)	Total VLP	51 ± 18		59 ± 28	61 ± 20
	Tailed VLP	63 ± 19		91 ± 60 <sup>(1)</sup> 87 ± 28 <sup>(2)</sup>	73 ± 23
Mean genome size (kb)		52 ± 61	59 ± 72	50 ± 65	52 ± 69

<sup>(1)</sup> with or <sup>(2)</sup> without giant viruses

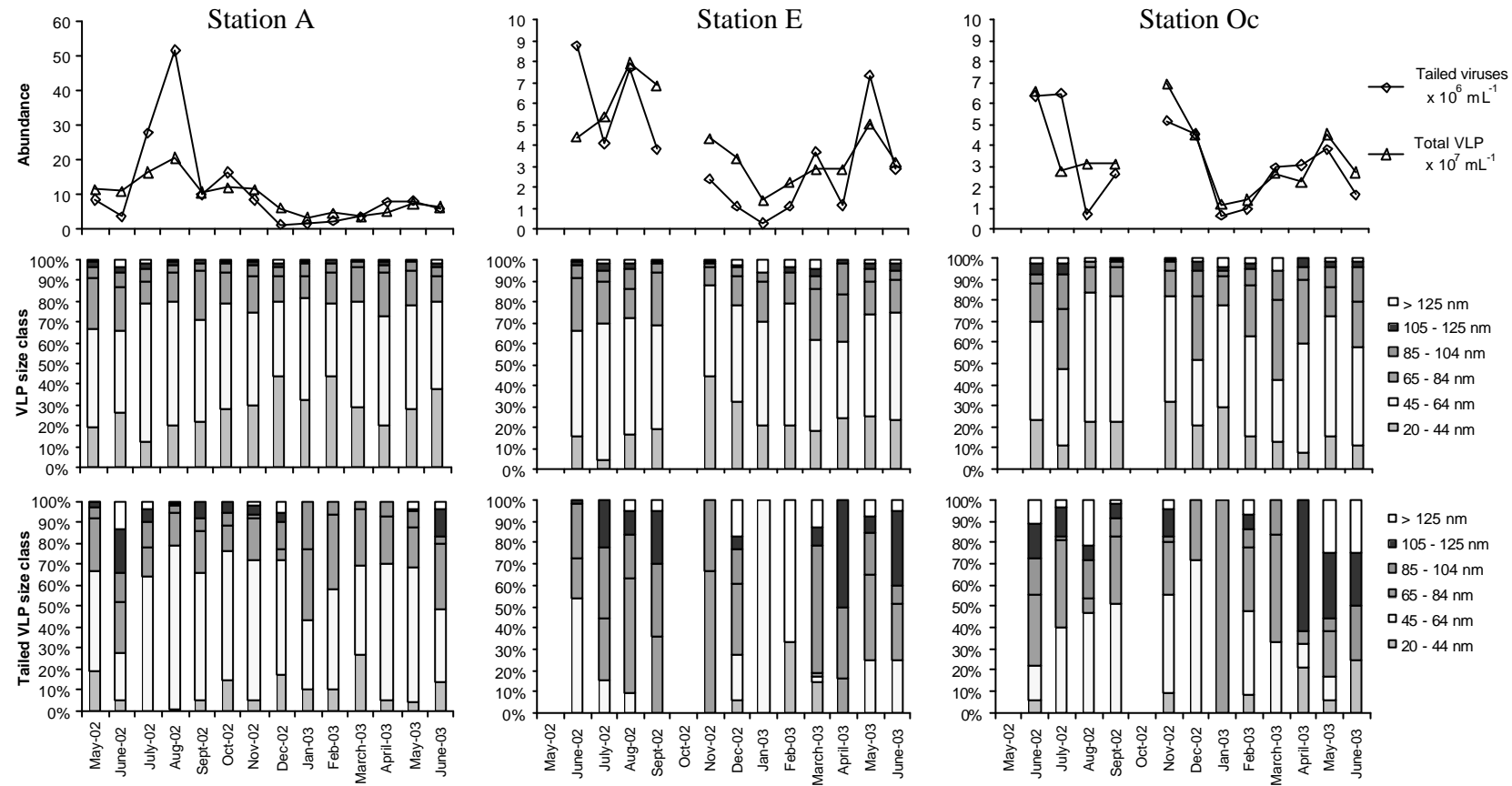


Figure 3.4 : Spatio-temporal variations in untailed and tailed VLP abundances and spatio-temporal frequency distribution of capsid size-class for total VLP and tailed VLP.

An additional peak of abundance also occurred in May 2003 at station E. Lower viral counts were recorded in January 2003 at stations A and E ( $3.6 \times 10^7$  and  $1.4 \times 10^7$  virus  $\text{mL}^{-1}$ , respectively). The temporal dynamic of the virioplankton community correlated well with the dynamic of the 45 – 64 nm size-class ( $r_s = 0.97$  for both stations A and E separately,  $p < 0.001$ , Figure 3.4). The 45 - 64 nm size-class and total VLP also covaried at station Oc ( $r_s = 0.64$ ,  $p < 0.05$ ) with several peaks of abundance in June 2002, November 2002 and May 2003.

Computing all the values obtained from the different times and stations, average head diameter of total VLP significantly increased ( $p < 0.001$ ,  $n = 1490$ ) from station A to Oc (Table 3.1). However, a chi-square analysis of frequency distribution of viral capsid size showed that the structure of virioplankton was independent ( $p < 0.05$ ) of the station and dependent ( $p > 0.05$ ) on the time of sampling. The capsid size classification revealed a strong dominance ( $71 \pm 5$  %) of small viruses ( $< 65$  nm, Figure 3.4) at all stations. Among these small viruses, the 45– 64 nm size-class significantly dominated by representing up to  $48 \pm 9$  %,  $50 \pm 7$  % and  $47 \pm 10$  % of total VLP at stations A, E and Oc, respectively. In contrast, the VLP = 65nm dominated the virioplankton (52 and 58 % in July 2002 and March 2003, respectively) at station Oc. In addition, two very large tailed viruses (523 and 352 nm, capsid size) were observed in December 2002 and June 2003 at station E (Figure 3.3).

Based on the results of the HAC, data set could be separated into four significant clusters on the AFC ordination plot (Figure 3.5). Groups 1 and 2 (five Oc water samples and two E water samples) were characterized by VLP = 65 nm, group 3 (samples from all stations) by 45 – 64 VLP and group 4 (only sample from station A) by small VLP ( $< 45$  nm).

In contrast with the results obtained for total VLP, the size-class analysis of tailed VLP revealed more pronounced differences ( $p > 0.05$ ) between stations (Figure 3.4). Average head diameter varied significantly ( $p < 0.001$ ,  $n = 891$ ) among stations and was always significantly higher ( $p < 0.001$ ) than head diameter of total VLP (Table 3.1). The 45 – 64nm size-class dominated all over the year at station A whereas the size-classes above 65 nm dominated at stations E and Oc. In addition, the tailed virus size-class richness seemed higher at station A, with at least four size-classes represented during the entire year, instead of only one at stations E and Oc, punctually (Figure 3.4).

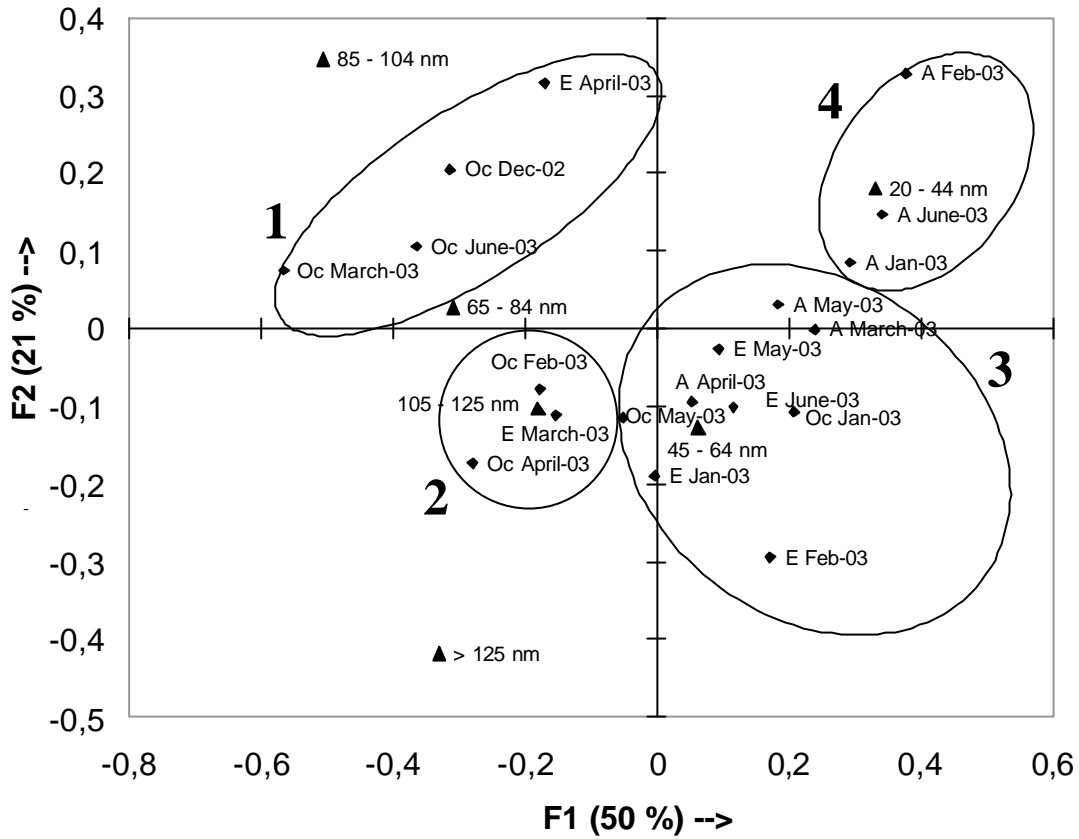


Figure 3.5: Ordination plot generated from relative abundance of each size-class of VLP (January to June 2003) in a factorial correspondence analysis (FCA). Water samples are from stations A (Charente River), E (Charente Estuary) and Oc (Pertuis d'Antioche). Clusters were drawn according to a hierarchical ascendant classification (HAC) applied to the coordinates of the samples on the first two axes of the FCA.

Although no significant differences were found in Shannon indices determined for each month and at three stations (data not shown), the general trend was a reduction of size polymorphism and increase in size with increasing salinities.

Tailed VLP covaried with total VLP at the three stations ( $r = 0.84, 0.68$  and  $0.64$  at station A, E and Oc, respectively,  $p < 0.05$ ). Large tailed VLP (= 105 nm) contributed highly ( $\geq 50\%$ ) to total tailed VLP in February and April 2003 at station E and from April 2003 to June 2003 at station Oc.

### 3.4.3. VLG structure of the viroplankton

Analysis of VLG diversity by PFGE revealed the presence of 36 different viral genotypes along the gradient and during the entire sampling period with an average of  $4 \pm 3$  bands per lane. Genome size ranged from 21 to 331 kb with a domination of two high-density regions (smear) at 33 – 41 and 53 – 64 kb and individual bands in the 250 – 265 kb region (Figure 3.6). Overall mean viral genome size ranged from 52 (stations A and Oc) to 59 kb (station D) without significant difference between stations ( $p > 0.05$ , Table 3.1). No fingerprint could be obtained from stations A, D and E samples collected in December 2002.

PFGE fingerprints were divided into 8 genome size-classes 21 - 60, 61 - 100, 101 - 140, 141 - 180, 181 – 220, 221 – 260, 261 – 300 and 301 – 340kb. During the sampling period, VLG below 100 kb made up 98, 92, 90 and 76 % of viral abundance in water samples at stations A, D, E and Oc, respectively (Figure 3.7).

From April to June 2003, the diversity of genome sizes (number of bands within a sample) was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in samples collected from December 2002 to March 2003. VLG in the 21 – 60 kb size-class were always present and dominant from January to June 2003. However, in December 2002 at station Oc, the 221 – 260 size-class was the only detected class. Viral genotypes in the 181 – 220 and 301 – 340 kb size-classes were only present in water samples collected in April 2003 at station E and Oc, respectively (Figure 3.7).

At all stations, the relative abundance of size-classes below 180 kb varied a lot with time. Variations in size-classes above this limit were only found at stations E and Oc. Viral genomes in the 181 – 220 and 261 - 300 kb size-classes peaked in April 2003 at station E. At this time, a peak in the 301 – 340 kb size-class also occurred at station Oc.

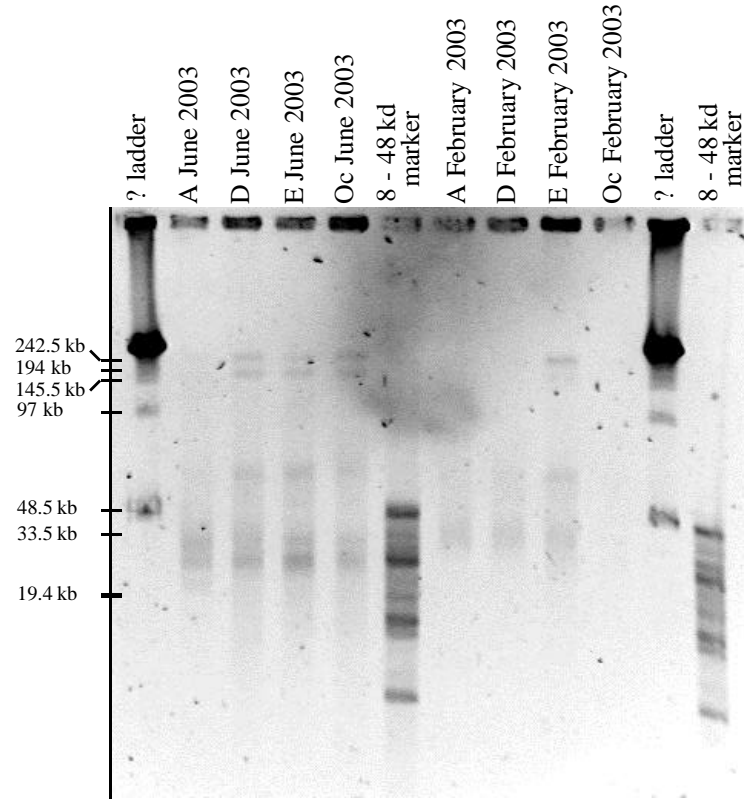


Figure 3.6: Example of PFGE banding pattern obtained for virus concentrates from stations A, D, E and Oc in February and June 2003. Stations and months are indicated at the top of the lanes while genome size (kb) is indicated on the left side of the gel.

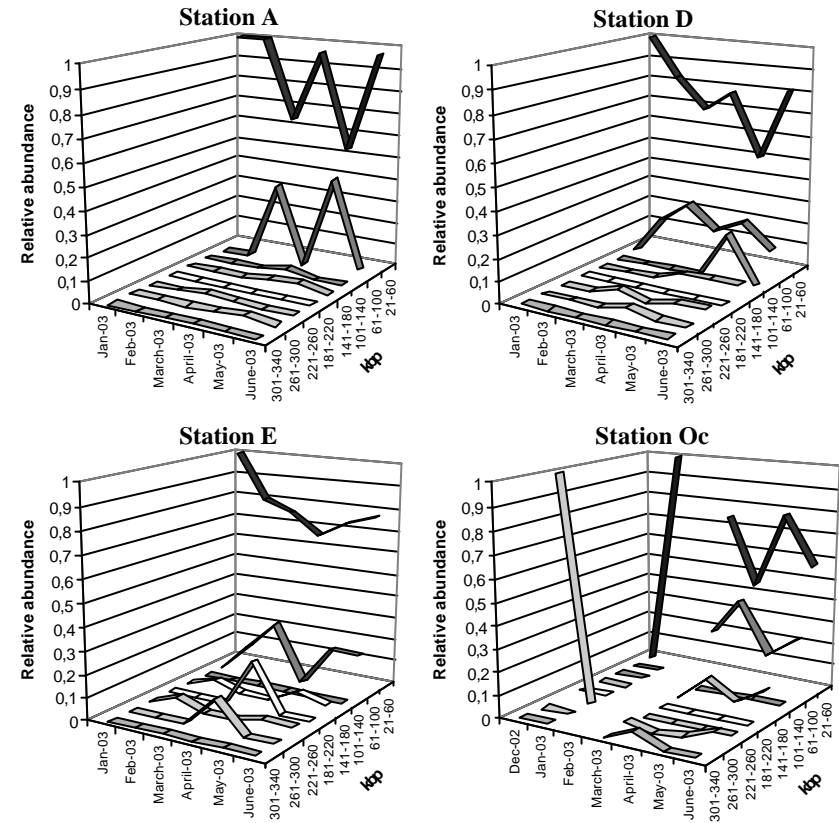


Figure 3.7: Relative abundance of each size-class of genome for stations A, D, E and Oc. Station Oc was not sampled in February 2003.

Based on the results of the similarity analysis, water samples clustered according to the time of sampling (Figure 3.8). Samples collected in May presented the closest PFGE fingerprints with similarity values ranging from 0.50 to 0.40. Due to a lower number of bands on their PFGE fingerprints, samples collected in January displayed low similarity values and formed individual clusters.

## 3.5. Discussion

### 3.5.1. Methodological considerations

PFGE and TEM are commonly used to provide information on the diversity of viroplankton. Although the two techniques are complementary since they provide information on different properties of VLP, it is still unclear to what extent results can be compared when both techniques are applied to similar samples. One should assume that they should be combined to provide a more complete picture of the structure of viroplankton communities. In this study we compared PFGE and TEM to determine if both methods provide redundant or complementary information on the morphological structure of viroplankton communities. Changes in the structure of viral communities were investigated along a salinity gradient and at different seasons.

Comparing PFGE and TEM requires some methodological considerations since the pre-treatment and processing of samples vary from one method to the other. Therefore, it was important to examine if these pre-treatments differently affect the samples to be sure that at the end of the process, similar samples are compared.

The presence of suspended organic and inorganic particles in water samples may interact with the observation of viral particles when observed by TEM (Fuhrman 1999, Wommack et Colwell 2000). To reduce this interference, we used an improved TEM protocol that include a clarification step before ultracentrifugation and was shown to have little effect (2.5 % reduction) on viral abundance (Montanié et al. 2002). When applied to our samples, this decrease in viral abundance was not observed and epifluorescence microscopy (EM) viral counts were even  $3 \pm 3.5$  % higher after clarification probably due to the removal of some masking effects (data not shown).

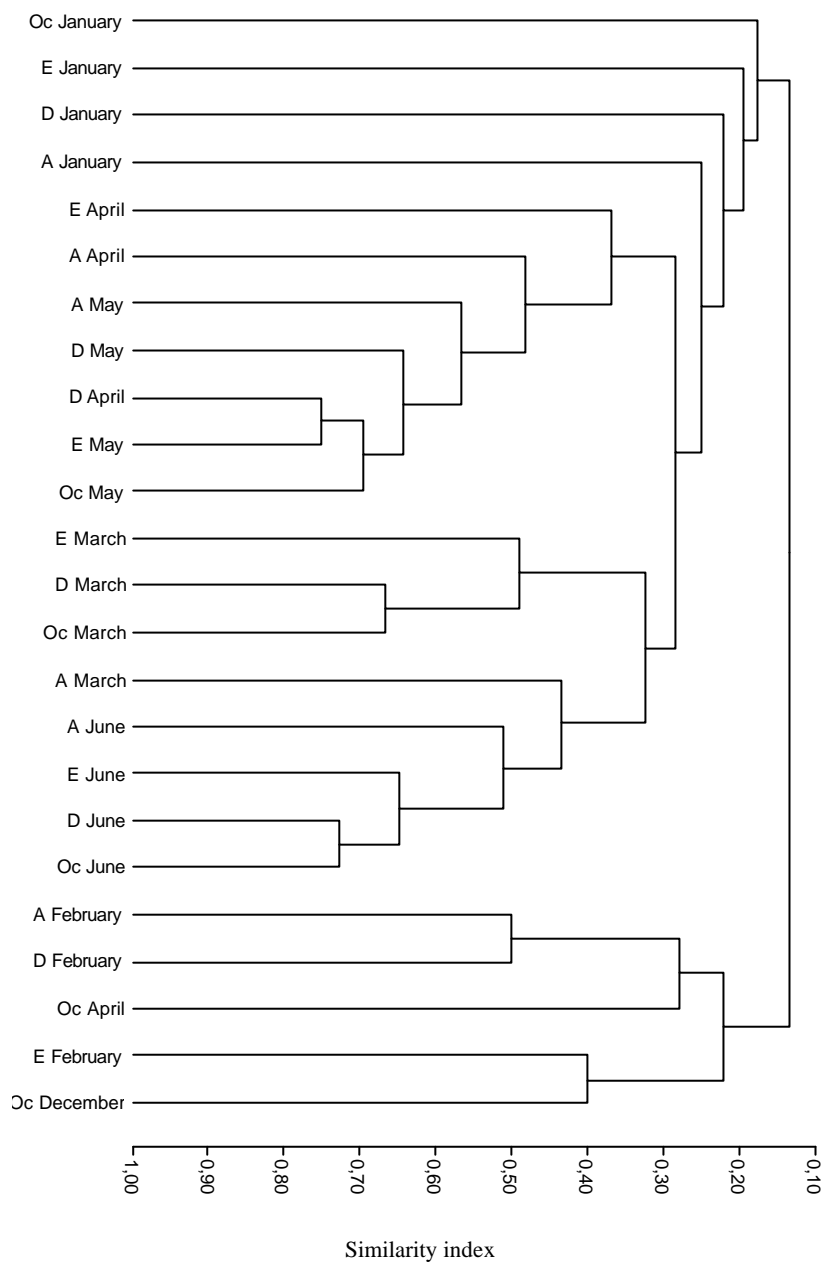


Figure 3.8: Dendrogram based on the similarity matrix generated from PFGE fingerprint banding patterns at stations A, D, E and Oc (from January to June 2003).



One possible source of bias in the preparation of PFGE concentrates, is the removal of large viral particles ( $> 0.2 \mu\text{m}$ ) by adding a filtration step upstream from ultrafiltration (Fuhrman 1999, Steward et al. 2000, Wommack et Colwell 2000, Riemann et Middelboe 2002). Paul et al (1991) found that the retention of viruses may be sometimes important and up to 60 % on average. In this study, the fraction of viruses retained onto the  $0.2 \mu\text{m}$  filter was determined by EM and was never higher than 15 % (data not shown). Abundance of VLP = 65 nm was always slightly lower for samples treated as PFGE concentrates including the filtration steps (compared to TEM concentrates without any upstream filtration, Figure 3.2). Consequently, this size fraction may strongly contribute to the 15 % loss of viruses. This was confirmed by plotting data on the relative loss of abundance due to pre-filtration treatment (Figure 3.9). The relationship clearly shows a logarithmic increase in the loss of VLP with increasing capsid sizes. Therefore, there is clear evidence that the  $0.2 \mu\text{m}$  filtration introduced a gradual loss of large viruses (= 65 nm) and could contribute to overestimate the proportion of small viruses in PFGE concentrate, and consequently small VLG. Nevertheless, abundances reported for each VLP size-class with or without the two additional filtration steps were similar, suggesting that both genomic and morphologic data should be considered as representative sub-samples of the same viral community.

### 3.5.2. Virioplankton diversity

The proportion of tailed viruses in our samples ( $8 \pm 4 \%$ ) was lower than previously reported in other studies (Wommack et al. 1999, Stopar et al. 2003). Although we cannot exclude the possibility of tail loss during the preparation of TEM grids, a significant fraction of non-tailed viruses may also infect eukaryotes and could contribute to higher abundances in our samples.

Based on the morphological criteria defined by the ICTV, tailed viruses were found to belong to the three families of the order Caudovirales (*Siphoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae*). The frequency of occurrence of the different morphotypes showed a higher domination of siphoviruses ( $88 \pm 8 \%$ ) than in previous studies (Wommack et al. 1992, Ackermann 2003). However, the proportion of the different families was very constant on both spatial and temporal scales, suggesting that the discrimination between is not relevant to investigate changes in the structure of virioplankton communities.

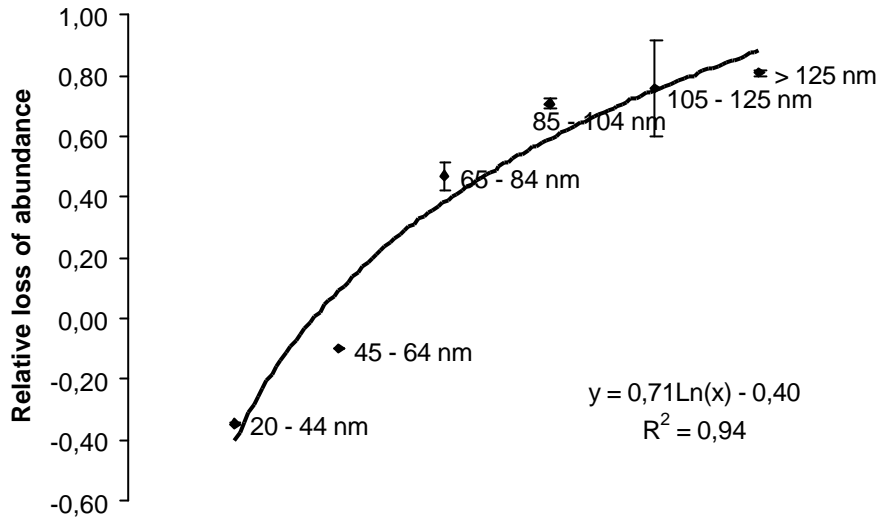


Figure 3.9: Relationship between the relative loss of viral abundance between TEM and PFGE concentrates and capsid size-class.

Similarly, the capsid size revealed analogous patterns at all stations with a net dominance of small VLP (< 65 nm) and great variations in the size-class 45 to 64 nm. Similar dominance of small VLP in aquatic viral communities have been reported in marine (Børsheim et al. 1990, Cochlan et al. 1993, Stopar et al. 2003), estuarine (Wommack et al. 1992) and freshwater (Hennes et Simon 1995) environments. Although data on the capsid diameter of naturally occurring aquatic viruses are scarce, the average diameter found at the marine station (Oc) was similar to values reported in other marine environments (Weinbauer 2004) whereas values obtained at the freshwater station (A) were slightly lower than those (62 to 68 nm) previously reported in lakes (Demuth et al. 1993). In the present study, capsid mean diameter of tailed VLP (bacteriophage) ranged from 63 to 91 nm and were in the range of values (60 to 80 nm) reported for purified marine bacteriophages (Frank et Moebus 1987, Børsheim 1993). Interestingly, average capsid diameters of tailed VLP were always significantly higher than those of total VLP suggesting that most VLP were not bacteriophages but the origin of untailed VLP remains unknown (prokaryotic or eukaryotic). Giant viruses (> 200 nm) were found at station E and similar large viruses were found in other aquatic environments (Weinbauer 2004). The presence of two giant tailed VLP in the size range of the smallest bacteria suggest that some tailed VLP may also infect eukaryotic cells.

Two assumptions must be voiced beforehand to viral PFGE fingerprint analysis. First, the nucleic acid resolved on the gel consists entirely of viral metagenome, because dissolved DNA is undetectable (Too diluted or too small, Wommack et al. 1999). Second, each genomic band is equivalent to one non-segmented viral genome. The range and mean genome size found in this study corresponded to previous values reported from marine viral assemblages (Steward et al. 2000). Before this study, no data concerning the genome size distribution of freshwater viral communities were available. Viral genomes from freshwater displayed the same bimodal distribution as viral genomes from estuarine and coastal stations with two mainly molecular size groups at 33 – 41 and 53 – 64 kb. This feature of viral genome distribution seems ubiquitous in aquatic virioplankton community since similar distribution was observed for many oceanic (Steward et al. 2000, Fuhrman et al. 2002, Riemann et Middelboe 2002, Weinbauer 2004) and estuarine locations (Wommack et al. 1999).

Table 3.2 : Simple ( $r_s$ , Spearman rank) correlation coefficients between VLPs capsid size-classes and viral genome size-classes. Only significant correlations are presented ( $p < 0.05$ ).

		VLP (nm)		VLG (kb)	
		< 65	= 65	< 100	100 – 200
VLP	< 65				
	= 65	<b>-0.85</b>			
VLG	< 100	<b>0.40</b>	<b>-0.42</b>		
	100 – 200			<b>-0.59</b>	
	> 200	<b>-0.38</b>	<b>0.41</b>	<b>-0.74</b>	<b>0.54</b>

### 3.5.3. Did TEM and PFGE provide comparable information?

When converting the density of bands into viral numbers, both PFGE and TEM revealed a dominance of small viruses at all stations. In April 2003 at station E, the presence of large VLG (181 – 220 and 261 – 300 kb) was concomitant with the occurrence of a high fraction of total VLP (40 %) larger than 65 nm. Similarly, in April 2003 at station Oc, a peak in the size-class 310–340 kb coincided with a peak in the size-class 105–125 nm of tailed viruses. More generally, we found a significant and positive correlation between small VLG (< 100 kb) and small VLP (< 65 nm) and between large VLG (> 200 kb) and large VLP (> 65 nm) (Table 3.2). We are not aware of other studies suggesting a positive correlation between viral genome size and capsid size. However, this relationship should be further investigated and should be more complex since some marine viruses (i.e., reoviruses) have a segmented genome.

### 3.5.4. Changes in virioplankton structure along the salinity gradient

Similar trends were found in the morphological and genomic structure of virioplankton. The diversity (richness) of VLP and VLG did not varied between stations, although a few minor differences were observed. We found that viruses with a large genome and capsid size were present in the marine environment but not in freshwaters. In contrast, a preponderance of larger viruses was found in a backwater system of the Danube river (Mathias et al. 1995). Unfortunately, the physico-chemical and biological properties of these waters were not characterized and the interpretation of these data is limited. It should indicate that salinity is probably not the primary factor driving the size distribution of viral communities in estuaries and further investigations should be done to determine if this size distribution is related to the structure of host communities.

In coastal ecosystems, the spatial dynamic of virioplankton and microorganisms communities is strongly influenced by physico-chemical parameters and the importance of mixing processes (Wommack et al. 1999, Riemann et Middelboe 2002). In the Charente Estuary, mixing processes are known to play a major role in the dynamic of the ecosystem and in the distribution of bacterial and viral abundance (Auguet et al. in press). These processes may partly explain the reported stability of virioplankton structure along the salinity gradient. However, freshwater masses never reach station Oc and the relative stability of some viral features along the salinity gradient may be explained by different hypotheses: (i) some

host populations are ubiquitous along the gradient (ii) viral descriptors such as genome and capsid size do not discriminate viral populations. There is some evidence from the literature that the structure of bacterial communities vary along salinity gradients and that most bacterial species in the marine part of the gradient are different from those found at the opposite extremity of the gradient (Prieur et al. 1987, Troussellier et al. 2002, Yokokawa et al. 2004). Therefore and although the structure of bacterial and phytoplankton communities was not analyzed in this study, the descriptors of viral communities which are determined by TEM and PFGE are probably not discriminant enough to relate changes in the structure of viroplankton with changes in host communities. However, large viruses were found in the marine part of the gradient and they may reveal the existence of specific marine host populations at the E and Oc stations.

### 3.5.5. Temporal changes in viroplankton structure

Like previous results obtained in the Chesapeake bay (Wommack et al. 1999), temporal variations were found along the salinity gradient in both total VLP abundance and viroplankton structure (genomic and morphologic, Figure 3.4). Changes in structure were more pronounced in saline waters at stations E and Oc as illustrated by the succession of dominant sub-populations of tailed VLP (Figure 3.4). It was confirmed by the UPGMA clustering method that temporal variability was much more important than spatial variability. From January 2003 to May 2003, total VLP abundance at the three stations increased by a 3.2 factor on average and during the same time bacterial production increased by a 10.4 average factor (Auguet et al. in press). Over the same period and although < 100 kb VLG remained dominant, the apparition of large viral genome and large tailed VLP at station E and Oc were concomitant with an increase of the genomic diversity. This suggested the existence of close interactions between bacterial and viroplankton communities and the dynamic in viral genome sizes may be related to variations in the structure of host communities.

Changes in viroplankton structure at station Oc contrasted with the stability generally reported for coastal waters (Steward et al. 2000, Fuhrman et al. 2002, Riemann et Middelboe 2002). The fluctuations reported in this study are probably due to important changes in environmental factors shaping viroplankton and host communities structure (Wommack et al. 1999). Therefore and although it does not allow the discrimination of viral populations, PFGE allowed to detect changes in the viroplankton structure which may be related to changes in host communities.

To our knowledge, this is the first paper reporting on the structure of viroplankton communities along a salinity gradient and using both morphological and genomic features. Interestingly, both PFGE and TEM results were consistent and provided similar trends. The two methods have revealed that small viruses (capsid and genome size) dominated freshwater as well as estuarine and coastal viral communities. Both PFGE patterns and capsid size frequency distribution revealed spatial and temporal changes in the structure of viral communities with an increased dynamic at the temporal scale. It means that these methods are sensitive enough to reveal an overall perturbation in the structure of viroplankton communities, although they are not discriminant enough to target changes at the population level. Furthermore, although some aspects of viral ecology can be understood through microscopic analyses, the use of PFGE alone should be enough for the monitoring of community changes. From these results, there is also clear evidence that molecular markers are needed to investigate viral ecology at the species level, although conceptual difficulties persist in defining a genome-base viral taxonomy.

## 4. Synthèse

Le suivi mensuel des paramètres microbiens et environnementaux au niveau de cinq stations situées le long de l'estuaire de la Charente nous a permis de montrer que :

**Le virioplancton correspond au membre le plus abondant du plancton dans l'estuaire de la Charente avec des concentrations ( $1.4 \cdot 10^7 - 20.8 \cdot 10^7$  PAV ml<sup>-1</sup>) à la limite supérieure de celles rencontrées en milieu aquatique.**

**Les bactéries constituent les principaux hôtes des virus dans l'estuaire suggérant une domination des communautés virales par les bactériophages.**

**Les abondances virales et bactériennes décroissent spatialement sur un gradient rivière – bassin et temporellement sur un gradient été – hiver.**

**Cette dynamique temporelle des abondances virales peut s'expliquer par un contrôle indirect de la température via le contrôle des abondances et de l'activité bactérienne (Figure 4.1). Sur le plan spatial, les abondances virales sont contrôlées directement par tous les phénomènes hydrodynamiques (débit, dilution...)**

**La dynamique du virioplancton correspond essentiellement à celle de particules de taille inférieure à 65 nm ( $71 \pm 5$  % du virioplancton) et à des populations virales dont le génome est inférieur à 100 kb ( $89 \pm 9$  % des génomes viraux).**

**Comme pour le contrôle temporel des abondances virales, la température joue un rôle important dans le contrôle temporel de la diversité virale via le contrôle de la diversité et de l'activité bactériennes (Figure 4.1).**





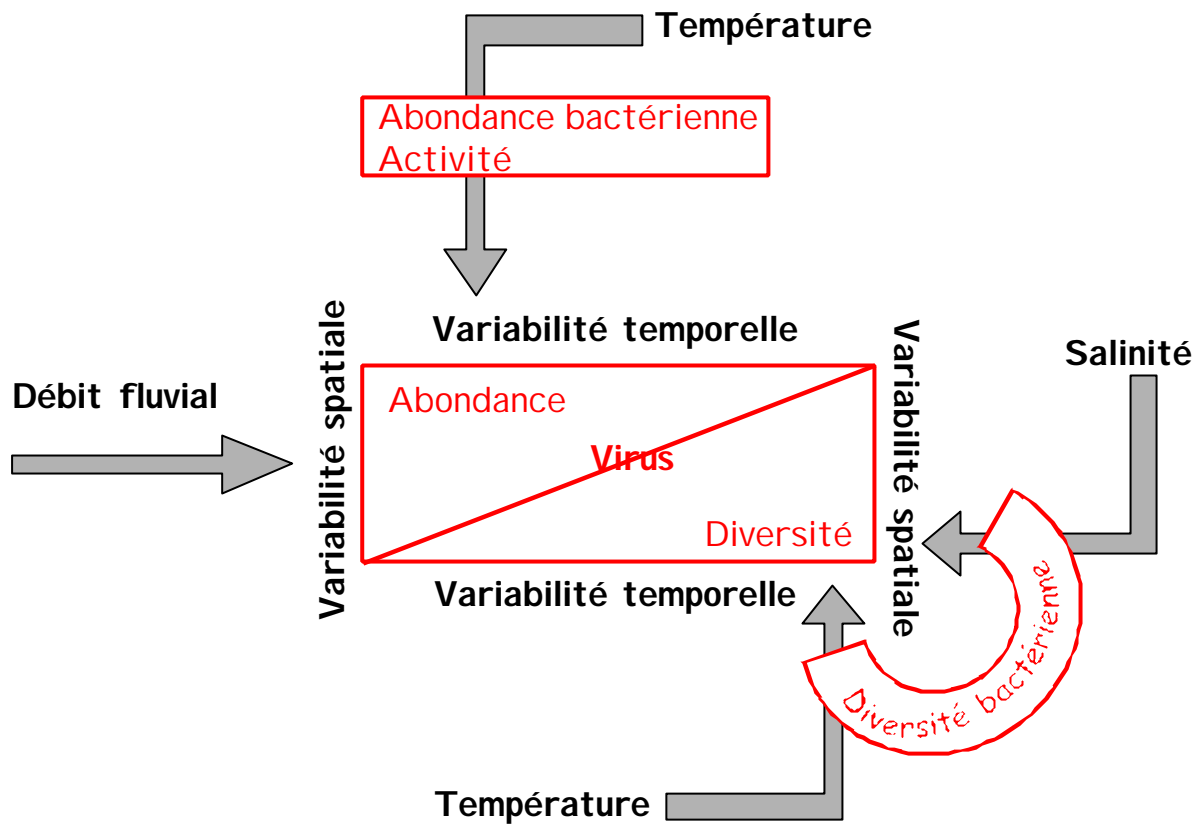


Figure 4.1: Schéma conceptuel du contrôle des abondances et de la diversité virale dans l'estuaire de la Charente.

**Le long de l'estuaire, malgré l'absence de données sur la diversité bactérienne, la présence de populations virales spécifiques aux eaux côtières semble indiquer l'existence de système hôte – virus la salinité joue un rôle important dans le contrôle de la diversité des communautés virales.** Nous n'excluons pas non plus la possibilité que les minimales différences spatiales dans la structure des communautés virales (1) résultent d'un grazing plus important des grosses PAV dans les eaux de la rivière que dans celles du bassin, (2) de propriétés physico-chimiques différentes des virions en fonction de la salinité et (3) de modifications du mécanisme d'adsorption des particules virales.

**Malgré quelques différences entre la structure des communautés virales dulçaquicoles et côtières, notamment la présence en plus grande quantité de populations à grande taille de génome et de capsid dans les eaux côtières, les deux structures présentent de fortes similitudes suggérant la présence de systèmes hôtes – virus communs ou génétiquement proches dans les deux écosystèmes.** Ce résultat plutôt étonnant à la vue de l'important gradient de salinité considéré, concorde avec une très récente étude faisant état de très fortes homologues dans les séquences d'un fragments de 592 bp du gène g20 de cyanophages dulçaquicoles et marins (Short et Suttle 2005).

La structure génomique et morphologique des communautés virales présente des modifications plus marquées dans le temps que dans l'espace ; et l'augmentation de la diversité génomique de l'hiver à l'été est concomitante à l'augmentation des abondances et des activités microbiennes. **Ceci suggère donc un couplage important entre l'évolution de la structure des communautés virales et l'activité et la structure de leurs communautés hôtes (i. e. bactéries).**

L'analyse d'un an de suivi dans l'estuaire de la Charente de la dynamique et de la structure du viroplancton a permis de conforter l'intérêt de l'étude de l'impact des virus d'eau douce sur les communautés bactériennes côtières. En effet, la forte similitude dans la structure des communautés virales suggère qu'il pourrait exister un transfert de particules virales de la rivière Charente vers le bassin de Marennes Oléron le long de l'estuaire de la Charente.

En outre, ce suivi a permis définir deux saisons fonctionnelles en tant que saisons clefs de la dynamique virale : une saison d'été de juin à septembre et une saison d'hiver de novembre à mars. Un cadre temporel a pu être ainsi dégagé pour concevoir des expériences *in vitro* concernant le comportement des virus dulçaquicoles.

## Partie 4 : Etude *in vitro*

Influence des particules virales dulçaquicoles sur les populations bactériennes du bassin de Marennes Oléron.

## 1. Introduction

Les bactéries représentent les principaux hôtes des virus dans l'estuaire de la Charente (partie 3, chapitre 2). Il apparaît dans la littérature que les effets des virus sur la dynamique, la productivité et la diversité du bactérioplancton peuvent être tant positif que négatif. La mortalité bactérienne d'origine virale (2 à 97 %, Wommack et Colwell 2000) est un exemple d'interactions négatives entre virus et bactéries. Dans certains cas, cette mortalité bactérienne par lyses virales peut dépasser la mortalité due au grazing (Weinbauer et Peduzzi 1995b). Cependant, les infections virales ne concernent qu'une partie des communautés bactériennes (Fuhrman 1992, Gonzalez et Moran 1997, Bratbak et al. 1998, Middelboe et Lyck 2002); alors que certaines populations sensibles sont défavorablement affectées par la présence de virus, les populations résistantes bénéficient des substances dissoutes libérées par la lyse des cellules sensibles et de la disparition de bactéries compétitrices. La mortalité bactérienne d'origine virale dépend non seulement des systèmes phage – hôtes présents et de la quantité de bactéries résistantes (Middelboe 2000, Wommack et Colwell 2000, Weinbauer 2004) mais aussi des interactions hôtes – virus (lysogénie ou lyse, Wilcox et Fuhrman 1994) et enfin des conditions environnementales (température, matière organique dissoute, nutriments...).

L'un des effets bénéfiques des virus serait le maintien de la diversité à l'intérieur des communautés bactériennes. Cette théorie connue sous le terme de « killing the winner » (Thingstad et Lignell 1997) repose sur deux postulats : (1) les virus présentent un spectre d'hôtes très réduit et (2) l'infection virale est densité – dépendante, i.e. la probabilité d'infection est d'autant plus importante que la densité des cellules hôtes est forte. Les blooms de certaines populations dominantes seraient donc contenus sous l'action des virus au profit du maintien de populations moins compétitives. Récemment, plusieurs études ont testé cette hypothèse sur des communautés bactériennes naturelles en modulant les abondances virales initiales dans différents microcosmes (Fuhrman et Schwalbach 2003, Schwalbach et Fuhrman 2004, Winter et al. 2004). Les changements dans la composition des communautés bactériennes observés par TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism, pour les trois études) et par ARISA (automated ribosomal intergenic spacers analysis, Schwalbach et Fuhrman 2004) ont été minimes, remettant en cause le rôle des virus dans le contrôle de la

composition des communautés hôtes. Selon les auteurs, ces faibles changements pourraient s'expliquer par l'utilisation d'un pas de temps trop court (90 - 120 h).

D'après l'analyse de la diversité génomique et morphologique des communautés virales de l'estuaire de la Charente, le virioplankton dulçaquicole et côtier présentent de fortes similitudes (Partie 3, chapitre 3). Ceci ajouté aux plus grandes abondances virales retrouvées dans la Charente suggère l'existence d'un transfert de particules virales dulçaquicoles de la rivière vers le bassin. Malgré l'existence de nombreuses études documentant tant les taux de mortalité bactériens d'origine virale (Proctor et Fuhrman 1992, Weinbauer et Suttle 1996, Bettarel et al. 2003, Winter et al. 2004) que la dynamique du virioplancton dans des écosystèmes estuariens (Almeida et al. 2001b, Hewson et al. 2001), aucune ne s'est intéressée à la capacité des virus dulçaquicoles (rivière) d'infecter les populations bactériennes côtières et aux conséquences de ces infections sur les abondances et la structure de ces populations dans un écosystème estuarien. L'objectif de cette partie est de vérifier si :

(1) Les virus dulçaquicoles conservent-ils leur virulence lors de leur transfert des eaux douces vers les eaux marines du bassin ?

(2) Les virus sont capables de retrouver leurs cellules hôtes dans les eaux côtières et auquel cas, s'ils participent au contrôle des abondances et de la composition des populations bactériennes ?

L'utilisation de cultures en batch ou de microcosmes s'avère très utile quand il s'agit d'étudier les réponses complexes d'une communauté bactérienne naturelle soumise à différents traitements. Toutefois il faut garder en mémoire que ces microcosmes ne représentent que des « maquettes » simplifiées du milieu naturel et qu'ils sont soumis à certains biais comme les effets de confinement (Simek et al. 1999). De plus les conclusions obtenues par ce type d'approche doivent être transposées au milieu naturel avec prudence (Zobell 1943).

Dans notre étude, deux types d'expériences d'enrichissement viral sur les populations bactériennes du bassin de Marennes Oléron ont été réalisées. Le premier type d'expériences, à court terme, nommé expérience d'ajouts dosés de virus, nous a permis de tester la capacité des virus dulçaquicoles à infecter les populations bactériennes côtières. Ces expériences d'ajouts dosés de virus constituent le premier chapitre de cette partie présentée sous la forme d'une publication en anglais.

Le deuxième type d'expériences, à long terme, a été conduit afin de tester l'impact du transfert de particules virales transportées par la Charente sur la structure des communautés virales et bactériennes du bassin

Les dates et modalités d'échantillonnage pour ces deux types d'expériences sont reportées dans le chapitre 6 « expériences *in vitro* » de la partie 2.

## 2. Effects of riverine virioplankton on marine bacterial productivity in the Bay of Marennes-Oléron (France)

From the paper submitted to Journal Of Plankton Research (Auguet J-C, Montanié H, Hartmann H-J, Lebaron P et Delmas D)

### 2.1. Abstract

Virus standard addition experiments (VSAE) were developed to test the effectiveness of viral infection of coastal bacteria (from the Marennes Oléron Basin) by riverine viruses (from the Charente River). The design of these experiments was based on addition of known viral concentrates resulting in  $\times 1.5$  and  $\times 2$  viral enrichment of diluted grazer free seawater. Bacterial abundance were strongly and quickly (within 6 hours) affect by viral concentrate additions. Riverine viruses were able to find corresponding host in coastal bacterial communities and were as virulent as coastal viruses. Virus mediated bacterial mortality varied from  $71 \pm 10 \%$  to  $79 \pm 3 \%$  for riverine and coastal viruses, respectively.

### 2.2. Introduction

The productivity of bacterioplankton in marine coastal water is affected by salinity, temperature, competition for available nutrients as well as by predation or viral lysis (Shiah et Ducklow 1994, Almeida et al. 2001a). Bacterial mortality by viral infection might reach values similar to those of predation by flagellates (Fuhrman et Noble 1995, Weinbauer et Peduzzi 1995b). However, viral mediated mortality depends on environmental conditions, on host-virus interactions (lysogeny versus lysis; (Wilcox et Fuhrman 1994), on phage-host systems and on the occurrence of viral-resistant bacteria (Middelboe 2000, Wommack et Colwell 2000, Weinbauer 2004). Batch cultures or microcosms, although not perfect representation of field ecosystems, constitute an interesting approach to study various phenomena as pollution or trophic interactions. Despite several virus mediated bacterial



mortality determinations (Proctor et Fuhrman 1992, Weinbauer et Peduzzi 1995a, Winter et al. 2004) and any previous reports of virus abundance along estuarine salinity gradient (Almeida et al. 2001a, Hewson et al. 2001), the ability of freshwater viruses to modulate coastal marine bacterioplankton was not still discussed. Estimates of phage production in marine environments suggest that most if not all bacteria are sensitive to phage attack; phage resistance has a physiological cost and sensitive hosts maintain a growth advantage over resistant clones (Wommack et Colwell 2000). But it is also assumed that (1) each bacterial host could acquired cross-resistance to most of its coccurring phages, (2) phage mutant could use alternate receptor to infect and (3) most of bacteriophage could be polyvalent (Wommack et Colwell 2000).

The experimental approach developed in this work was intended to answer the question of the effectiveness of viral infection of coastal marine bacteria by riverine virioplankton.

## 2.3. Methods

### 2.3.1. Study site and Sampling

The Marennes Oléron Basin (45° 59' 06"N) is a shallow embayment (5 m average depth) characterised by a short water residence time (4 to 10 days, Laboratoire Central hydraulique de France). The Charente River is the major source of freshwater and continental input into the Basin. River discharge ( $60 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ , year average) and mixing processes play a crucial role in controlling the distribution of microbial abundance (virus and bacteria) and nutrients along the Charente Estuary (Auguet et al. in press).

Surface water samples (15 – 40 L) for virus standard addition experiments (VSAE) were collected at two stations located at both extremities of the Charente Estuary: (1) in the Charente river river, 50 km upstream from the mouth of the Charente estuary (0.2 PSU, station A) and (2) in the Marennes Oléron Basin, in the plume of the Charente estuary (> 30 PSU, station E). Samples were collected in acid rinsed (10 % HCl) polypropylene opaque bottles kept to *in situ* water temperature during transport to the laboratory. Sampling was always undertaken when the influence of river waters was maximal on the Marennes Oléron Basin: at the ebb cycle of spring tide.

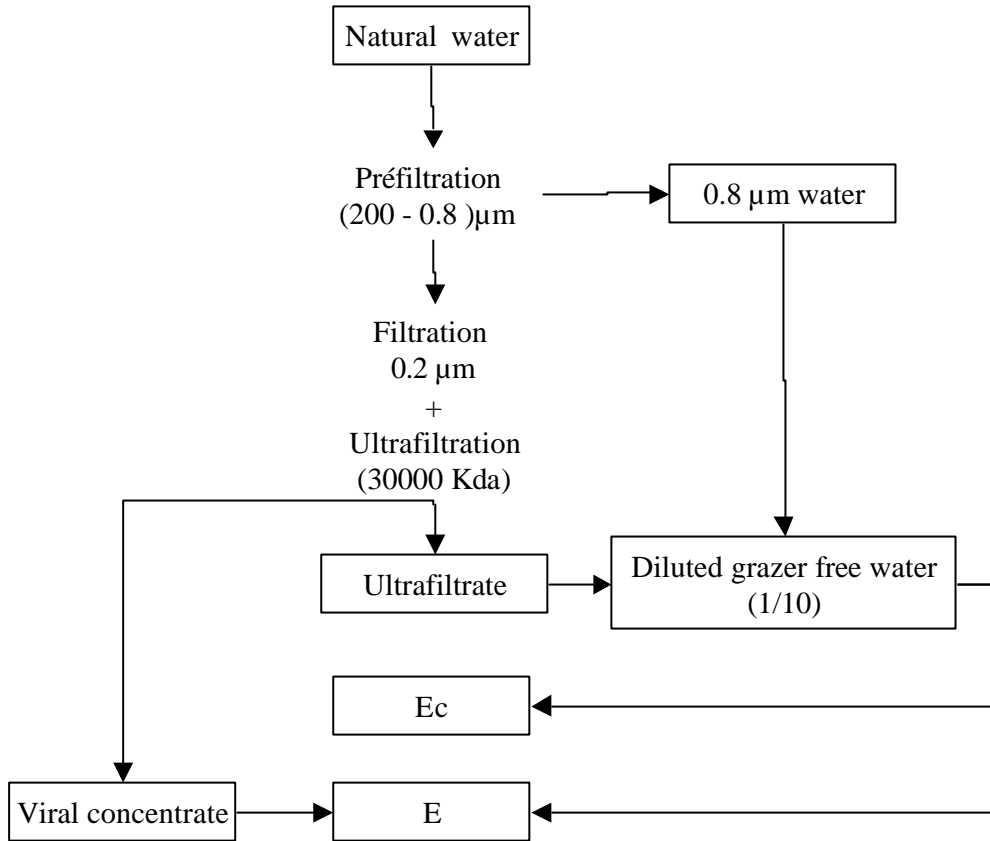
### 2.3.2. Preparation of viral concentrate and grazer free water

The rate of virus mediated bacterial mortality was determined from calibration curves obtained from VSAE. The design of these experiments was based on addition of known viral concentrates into diluted grazer free water.

To make viral concentrate and grazer free water, 15 to 40 L of seawater were prefiltered through a succession of strainers (nylon fibers, Saratofil) with porosities ranging from 250 to 25  $\mu\text{m}$  pore size (Fig. 1). Then, seawater was filtered using two successive barriers mounted in stainless filter holders (3 and 0.8  $\mu\text{m}$  pore size filters, 142 mm diameter, Sartorius). At this step, a part of the 0.8  $\mu\text{m}$  filtrate constituting grazer free water was put aside and stored at *in situ* temperature until the start of the experiments. Bacteria present in the rest of the 0.8  $\mu\text{m}$  filtrate were removed by a filtration step on a 0.2  $\mu\text{m}$  pore size filter (142 mm diameter, Sartorius). Viruses from the 0.2  $\mu\text{m}$  filtrate were concentrated by tangential ultrafiltration (Ultraslice support, 30 Kda cut-off, polysulfon membrane, Sartorius) to a volume of approximately 200 mL resulting in a concentration factor of 7. Virus free seawater (ultrafiltrate) was used to produce a 10 fold dilution of the 0.8  $\mu\text{m}$  filtrate so as to obtain the diluted grazer free water. Viral abundance was determined in both viral concentrate and ultrafiltrate in order to calculate the concentration factor and to check for the absence of virus, respectively.

### 2.3.3. Preliminary experiment set up

A preliminary experiment was conducted in order to examine the effect of virus enrichment on bacterial dynamics and to answer to some methodological points of the experimental design: (1) loss in bacterial abundance due to filtrations, (2) degree of agreement between the theoretical enrichment factor and the observed one and (3) absence of change in initial bacterial abundance in flasks amended with viral concentrate. Treatments were not replicate.



**Fig. 1:** Preliminary experiment set up.

**Table I:** Treatment used in virus standard addition experiments (VSAE). The control correspond to non enriched bottle; E, A and Ainact (inactivated A) correspond to the different treatment with riverine (A), seawater (E) standards. 1.5 and 2 are two theoretical standards.

Flasks	Origin of 0,8 µm water	Origin of viral concentrate	Treatment
Control	E		1/10 dilution
E <sub>1.5</sub>	E	E	1/10 dilution × 1.5 enrichment
E <sub>2</sub>	E	E	1/10 dilution × 2 enrichment
A <sub>1.5</sub>	E	A	1/10 dilution × 1.5 enrichment
A <sub>2</sub>	E	A	1/10 dilution × 2 enrichment
Ainact <sub>1.5</sub>	E	A	1/10 dilution × 1.5 enrichment inactivated concentrate
Ainact <sub>2</sub>	E	A	1/10 dilution × 2 enrichment inactivated concentrate

Surface water sample for this preliminary experiment was collected on November 2003 at station E. This experiment was conducted in two acid rinsed (10 % HCl) 5 L Erlenmeyer flasks that received 400 mL of 0.8  $\mu\text{m}$  seawater. One treatment flask (E) was amended with 114 mL of viral concentrate so as to obtain a  $\times 2$  viral enrichment. Finally, the control flask (Ec) and E were filled with virus free seawater to a final volume of 4 L. The flasks were incubated for 90 h in the dark at in situ temperature and under agitation. Subsamples for bacterial and viral counts were taken from each flask at regular intervals (every 6 h the first 18 h, then every 12 h).

The volume of viral concentrate added was derived from the calculation of the theoretical enrichment factor (Proctor et Fuhrman 1992) and corresponded to:

$$V_{vc} = (E_{ft} \times V_i) / (CF \times D)$$

where  $V_{vc}$  is the volume of viral concentrate in mL,  $E_{ft}$  the theoretical enrichment factor (2),  $V_i$  the volume of the incubations, CF the concentration factor (seven) and D the dilution factor (ten).

The observed viral enrichment factor was calculated as the ratio viral abundance in enriched flasks at  $t_0$  / viral abundance in the control at  $t_0$ .

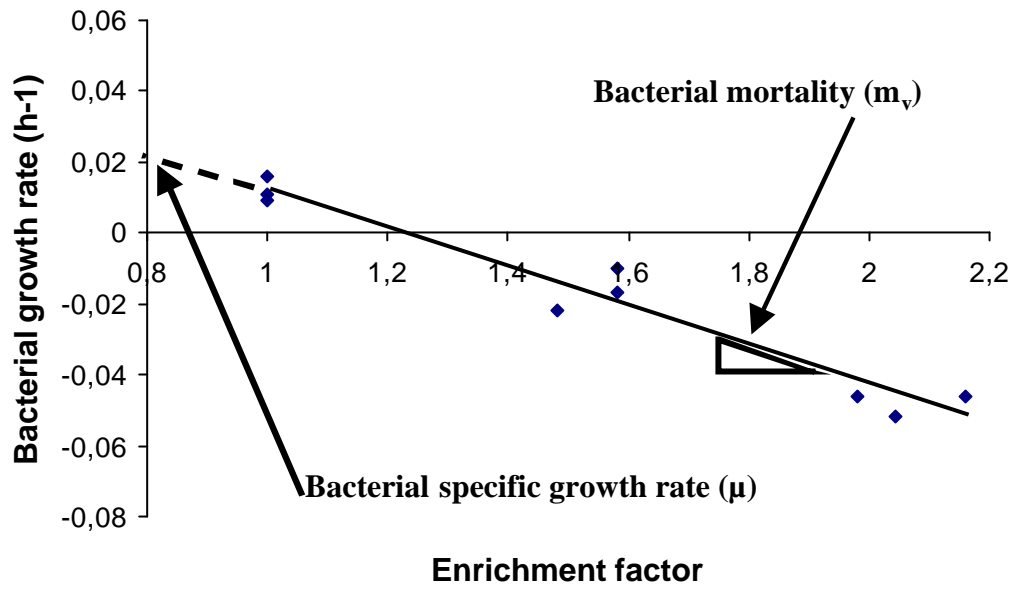
Bacterial mortality ( $B_m$ ) due to viral enrichment was calculated as:

$$B_m = (\mu_{Ec} \times C_{b0Ec}) - (\mu_E \times C_{b0E})$$

where  $\mu_{Ec}$  and  $\mu_E$  are the bacterial growth rates in Ec and E, respectively;  $C_{b0Ec}$  and  $C_{b0E}$  are the bacterial abundance at  $t_0$ .

#### 2.3.4. Virus standard addition experiments (VSAE)

Water samples for VSAE were collected on February, March, June and July 2004 at station A and E simultaneously. Three types of viral concentrates, corresponding to three treatments, were prepared: E, A and Ainact (inactivated viral concentrate from station A) (Table I). Inactivation of viral concentrates were achieved using UV radiations (15 min, 250 nm, Mars 2004) or microwave treatment (two cycles of three min at 800 W, June and July 2004). For each treatment, two theoretical viral enrichments ( $\times 1.5$  and  $\times 2$ ) of diluted grazer free water, corresponding to two different standards, were tested.



**Fig. 2:** Example of regression analysis of dose response curve (February 2003) obtained by plotting bacterial growth rate calculated from VSAE experiments versus viral enrichment factor (standards). Enrichment factor in controls corresponded to natural viral enrichment (i.e.  $\times 1$ ).

Non enriched diluted grazer free water constituted the third standard (control). Incubations were done in triplicate for each standard and a given treatment. Hence, incubations were conducted simultaneously in 21 acid rinsed (10 % HCl) 300 mL polycarbonate bottles that received 25 mL of virus free grazer seawater from station E. According to month and treatment, from 1.7 to 6 mL or 3 to 14 mL of viral concentrate were added to grazer free water to obtain a  $\times 1.5$  or a  $\times 2$  viral enrichment, respectively. After addition of viral concentrate, bottles were filled with virus free water from station E to a final volume of 250 mL. Conditions of incubation were analogous to those of the preliminary experiments. Two subsamples for bacterial and viral counts were taken sterilely from each bottle every 6 h during the first 18 h.

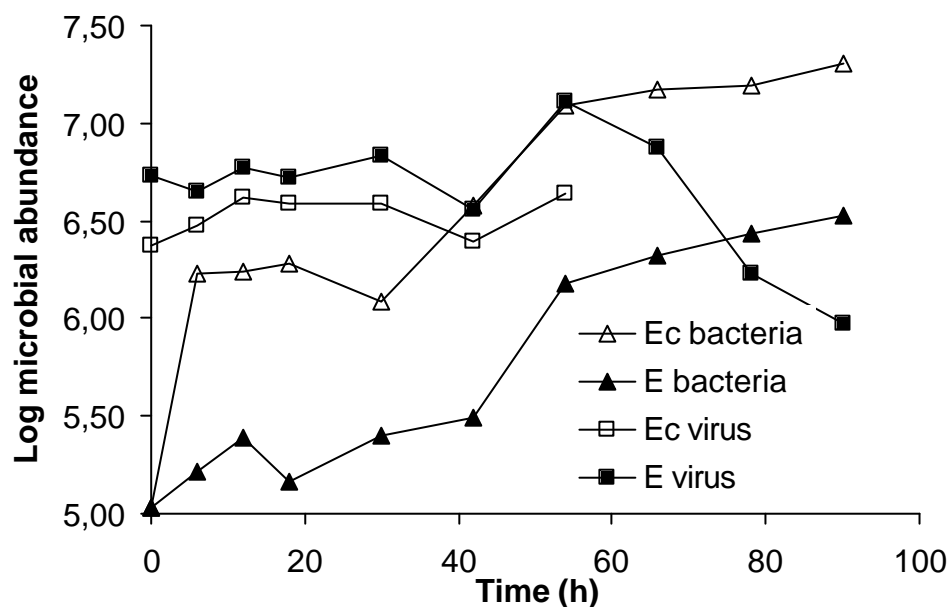
For each treatment (E, A and Ainact), bacterial growth rates were calculated in each bottle and plotted versus standards (expressed in term of observed viral enrichment factors) in a dose response curve (Fig. 2). Because the maximal effect of virus enrichment was measured as early as 6 h of incubation in the preliminary experiment, bacterial growth rates were calculated within the first 6 h of culture in the VSAE. This period can be considered as a one step growth experiment since latent periods, reported for nine marine phages, varied from 1 to 8 hours (Proctor et al. 1993). Control incubations were a common standard to all treatments and corresponded to a viral enrichment of  $\times 1$ . The slopes and the y-axis intercept of regression curves corresponded to the specific bacterial mortality due to virus ( $m_v$ ) and to the specific bacterial growth rate ( $\mu$ ) in absence of virus, respectively. The difference between slopes obtained for each treatment and the temporal difference between slopes for treatment were tested using an analysis of covariance (Zar 1999).

### 2.3.5. Enumeration of virus and bacteria

For viral and bacterial counts, 2 mL of water samples were withdrawn with a sterile pipette, immediately fixed with 0.2  $\mu\text{m}$  filtered formaldehyde (final concentration 2 % v/v) and stored at 4°C until analysis. Virus and bacteria were enumerated on the same membrane using nucleic acid staining (SYBR Green I) and epifluorescence microscopy according to Noble and Fuhrman (1998).

**Table II:** *In situ* microbial and environmental characteristics of sampling stations.

Month	Station	<i>In situ</i> viral abundance ( $\times 10^7$ VLP mL <sup>-1</sup> )	<i>In situ</i> bacterial abundance ( $\times 10^6$ cells mL <sup>-1</sup> )	<i>In situ</i> T (°C)
November	E	4.51	1.79	13
February	E	1.23	1.46	7.5
March	A	2.02	3.44	11
	E	1.33	2.41	9.6
June	A	4.64	6.39	17
	E	3.10	5.16	16.6
July	A	9.20	8.16	21
	E	4.00	5.56	20.2


**Fig 3 :** Development of viral and bacterial abundance during the preliminary experiment. Ec and E represent the control and the  $\times 2$  enriched Erlenmeyers, respectively.

## 2.4. Results and discussion

During sampling months, temperatures of surface water range from 7.5 to 21.0 °C (Table II). Viral and bacterial abundance varied from  $1.33 \times 10^7$  to  $9.20 \times 10^7$  VLP mL<sup>-1</sup> and from  $1.49 \times 10^6$  to  $8.16 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, respectively with slightly higher microbial abundance at station A.

### 2.4.1. Preliminary experiments

Filtration of seawater through the different strainers and filters resulted in a diminution of 15 % of bacterial abundance into the 0.8 µm filtrate. The observed enrichment factor ( $\times 2.24$ ) at the start of the experiment reflected the expected enrichment in E ( $\times 2$ , Fig. 3). Furthermore, the addition of viral concentrate did not modify initial bacterial abundance in comparison to the control (Fig. 3).

Besides those methodological considerations, the preliminary experiment permitted to reveal the important impact of a  $\times 2$  viral enrichment on bacterial growth and the response time of bacteria to this viral enrichment. As Proctor and Fuhrman (1992) that observed a significant diminution of bacterial abundance in enriched incubations at the end of their experiments, in our study, final bacterial abundance were reduced by a factor 6 in E in comparison to Ec (Fig. 3). This diminution was due to a 84 % reduction of bacterial growth in E during the first 6 h of incubation corresponding to a bacterial mortality of  $1.81 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. After Hour 6, the development of bacterial abundance was similar in Ec and E and showed a great increase over 90 h (by a factor 100 on average). Contrary, the development of viral abundance was stable in Ec and E until the mid log phase of bacterial growth (Hour 42). Between Hour 42 and 54, viral abundance was multiplied by 1.8 and 3.5 in Ec and E, respectively. Afterwards, in E, viral abundance showed a dramatic decrease (by a factor 14) corresponding to the start of the stationary phase of bacteria.

Bacterial response time used to calculate the bacterial mortality due to virus ( $m_v$ ) varied from 12 to 24 h in previous studies (Proctor et Fuhrman 1992, Almeida et al. 2001b). In their dilution approach, Evans et al (2003) underlined the importance of the duration of incubations as a critical factor in determining the calculation of  $m_v$ .



**Table III:** Viral concentrations ( $C_v$ ) and virus to bacterium ratios (VBR) observed at the start of VSAE experiments.

	February		March		June		July	
	$C_v$ $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	VBR	$C_v$ $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	VBR	$C_v$ $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	VBR	$C_v$ $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	VBR
Control	1.97	21	1.44	42	2.01	16	3.26	20
E <sub>1.5</sub>	3.04	27	1.80	63	2.53	18	4.10	22
E <sub>2</sub>	4.06	33	2.39	84	4.15	27	6.91	36
A <sub>1.5</sub>			1.88	61	2.47	18	3.86	19
A <sub>2</sub>			2.49	65	4.03	28	6.00	30
Ainact <sub>1.5</sub>			2.09	61	3.49	24	3.71	21
Ainact <sub>2</sub>			2.54	65	4.54	30	5.83	31

**Table IV:** Results of VSAE conducted on February, March, June and July 2004. ( $C_{bt0}$ ) are average initial abundance of bacteria for each treatment. Bacterial specific growth rate in absence of virus ( $\mu$ ) and bacterial virus mediated mortality ( $m_v$ ) were derived from regression analysis of dose response curve plots (Fig. 2). Values between brackets are values of  $\mu$  and  $m_v$  before removal of summer viral enrichment above  $\times 2$ . (\*) indicates the significance of the regression analyses whereas p (ANCOVA) represents the significance of covariance analyses between all treatment regression curves. Production lysed =  $(\mu \times C_{bt0}) - (m_v \times C_{bt0})$ . Ainact: UV inactivation in March and microwave treatment in June and July.

months		$C_{bt0}$ ( $\times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ )	Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	$M_v$ (h <sup>-1</sup> )	% of production lysed	p (ANCOVA)
February	E	10.8	0.067	0.055***	82	
	E	3.04	0.095	0.076*	80	
March	A	3.45	0.095	0.065***	68	0.52
	Ainact	3.57	0.073	0.048**	64	
June	E	14.0	0.087 (0.033)	0.071 (0.026)	79	$5.06 \times 10^{-3}$
	A	13.4	0.089 (0.044)	0.066* (0.028)	63	
	Ainact	14.1	0.034	0.011*	32	
July	E	18.0	0.083 (0.020)	0.071* (0.023)	76	$2.18 \times 10^{-7}$
	A	18.8	0.065	0.054**	83	
	Ainact	17.6	0.023	-0.034***	0	

 \*  $p < 0.05$ 

 \*\*  $p < 0.01$ 

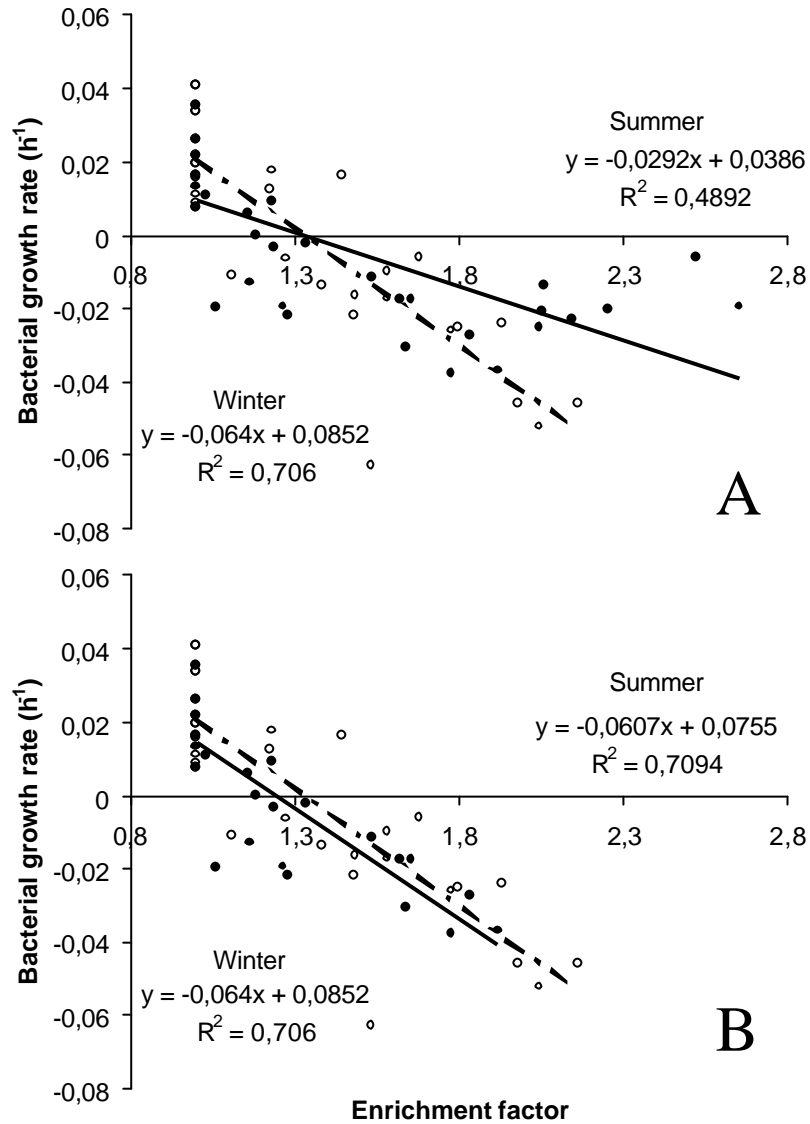
 \*\*\*  $p < 0.001$

Although we cannot affirm that the strong reduction of bacterial abundance in the enriched Erlenmeyer was only due to viruses, this experiment showed that the time response of bacteria to viral addition was very short (6 h). Therefore, bacterial growth rates in VSAE were calculated during the first 6 h of incubation.

#### 2.4.2. Virus standard addition experiment (VSAE)

Immediately after addition of viral concentrates, into  $\times 1.5$  and  $\times 2$  enriched incubations, viral abundance increased by  $\times 1.4 \pm 0.2$  ( $n = 10$ ) and  $\times 1.9 \pm 0.2$  ( $n = 10$ ), respectively, confirming the good agreement between the theoretical and observed enrichment factor. Neither UV nor microwave treatments altered the physical integrity of viral particles, as indicated by the no significant difference ( $p > 0.05$ ) in initial viral abundance between A and Ainact treatments (Table III). Virus to bacterium ratios (VBR) for each type of treatment were similar among experiments except in March where VBR were doubled on average. This increase was consecutive to an increase of suspended solid concentrations (data not shown) that reduced the number of bacteria in the  $0.8 \mu\text{m}$  filtrate by plugging of filters. The loss of bacteria due to filtration steps ( $53 \pm 27\%$  on average) resulted in higher VBR in controls than in natural water. Bacterial growth rates in controls were always positive within 6 h of incubation indicating that negative growth rates observed in treated bottles were due to viral enrichment.

Except in June for E treatment, a significant relationship ( $p < 0.05$ ) occurred between bacterial growth rates and enrichment factors in VSAE conducted on February, March, June and July 2004 (Table IV). Analysis of VSAE curves for each experiment showed that values of  $\mu$  and  $m_v$  in E and A treatments were not significantly different ( $p > 0.05$ ). Moreover,  $m_v$  and  $\mu$  combined for E and A treatment were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in winter (February and March) than in summer (June and July).



**Fig. 4:** Seasonal dose response curves. A: winter (February and March 2004, empty circles; n = 27) and summer (June and July 2004, full circles, n = 36) dose response plot for treatment A and E. B: Seasonal dose response plot corrected for saturation values above a  $\times 2$  enrichment factor. Full line and dotted line represented summer and winter regression curves, respectively.

Without any difference between E and A treatments, bacterial growth rates were grouped by season for both treatments in VSAE curves (Fig. 4). In summer, above a  $\times 2$  viral enrichment, bacterial growth rate levelled off to a constant value ( $-0.018 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$ , Fig. 4). This plateau may correspond to a limitation of effective rate of infection and consequently bacterial cell lysis. This saturation of viral infections was already observed in terms of photosynthesis impairment (Suttle 1992). Several alternative hypotheses may explain this saturation of viral infections in summer. First, interactions type (lytic or lysogenic) and phage – host systems may be different on a seasonal scale, because temporal changes in viral community structure, analysed by pulsed field gel electrophoresis and transmission electron microscopy, were more pronounced than spatial ones (data not shown). Second, this saturation combined to higher abundance of potential hosts and lower VBR in summer suggested that only a subset of bacterial cells was sensible to viral infections. Under favourable growth conditions (i. e. in summer), it is likely that bacteria can use more energy for resistance mechanisms making them less sensitive to viral infections. This suggests higher abundance of resistant bacteria in summer than in winter. Literature concerning the influence of temperature on the resistance of bacteria to virus infection is scarce. However, it has been suggested that the quantity of resistant cells depends on the cost of resistance, which in turn depends on a set of biological and environmental parameters including temperature (Bohannan et Lenski 2000). In addition, resistant populations may have been stimulated by nutrients present in viral concentrates.

The presence of this plateau lowered summer value of  $m_v$  and  $\mu$  (Fig. 4). To calculate summer  $m_v$  and  $\mu$  in the linear part of VSAE curve, data obtained above a  $\times 2$  viral enrichment were removed (Fig. 4). The consequence of this correction was a non significant difference between  $m_v$  and  $\mu$  values in summer and winter (Fig. 4, Table IV).

Except in March,  $m_v$  values of Ainact treatment were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than those of E and A treatment confirming that bacterial mortality was essentially caused by a heat labile bioactive component (i. e. viruses). Contrary to UV treatment (March), microwaving viral concentrates reduced significantly (by 4.7) the percentage of bacterial production lysed by viral infections (Table IV) and even stimulated bacterial growth in July probably due the presence of nutrients in the concentrates (Proctor et Fuhrman 1992, Noble et Fuhrman 1999, Noble et al. 1999). However, the mortality of bacteria persisted even after inactivation of concentrates. This residual mortality may be attributed to non inactivated virus

(heat or UV resistant) or, as already proposed (Suttle 1992), to a heat resistant high molecular weight bioactive substance.

The most interesting result of this study was the absence of significant difference ( $p < 0.05$ ) between  $m_v$  values found for E and A treatment suggesting that freshwater viruses were able to find corresponding hosts in coastal bacterial communities. This result was quite questioning and one explanation may be the presence of freshwater halotolerant bacterial populations brought by the Charente in the basin. Since  $m_v$  values were equivalent with both viral concentrates, this also supposed that freshwater bacterial populations may represent a significant subset (in term of abundance and activity) of coastal bacterial communities. This capacity of freshwater viruses to infect allochthonous bacterial populations may be also attributed to the existence of a broad host range or polyvalence. Some studies have demonstrated the existence of polyvalent viruses in natural waters (Suttle et Chan 1993, Waterbury et Valois 1993, Wichels et al. 1998). One could see this polyvalence as an adaptation to high dynamic ecosystems such as estuaries.

Many approaches have been design to estimate the viral induced mortality of bacterioplankton: precedent virus mediated mortality of prokaryotes range from 2 to 97.3 % with an average of 29 % (Wommack et Colwell 2000). In our study, freshwater and coastal viruses were able to lysed  $71 \pm 10$  and  $79 \pm 3$  % of bacterial production, respectively (Table IV). The removal of potential source of viral losses (protists grazing, UV and adsorption on particule) may explain the fact that these values of virus mediated bacterial mortality were at the high end of previously published values.

The experimental design use in this study permitted to show that mediated virus mortality of bacteria was high and occurred rapidly in absence of virus losses. Furthermore, although this virus mediated bacterial mortality may be lower in natural waters, our results suggested that Charente viral input might have a non negligible impact on bacterial productivity in the Marennes Oleron Basin.

## 3. Influence des virus dulçaquicoles sur la composition des communautés bactériennes et virales côtières

### 3.1. Protocole expérimental

#### 3.1.1. Préparation des fractions d'eau

Le plan des expériences d'enrichissement viral à long terme correspond à celui de l'expérience préliminaire décrite dans le chapitre précédent (partie 4, paragraphe 2.3.3) ; il est basé sur l'addition d'un concentrat viral dans un Erlenmeyer contenant de l'eau du bassin filtrée 0.8  $\mu\text{m}$  afin d'exclure les flagellés et diluée 10 fois afin (1) de permettre l'obtention d'un facteur d'enrichissement viral suffisant et (2) d'offrir un « potentiel » de croissance aux bactéries.

L'obtention des différentes fractions (concentrat viral, eau du bassin 0.8  $\mu\text{m}$ ) s'est effectué de la même manière que dans les expériences d'ajouts dosés de virus dans la mesure où une partie des aliquots de chaque fraction a servi aux expériences à court terme et l'autre partie aux expériences à long terme. Très synthétiquement, la fraction d'eau 0.8  $\mu\text{m}$  est obtenue à la suite d'une série de filtrations différentielles sur une série de tamis et de filtres et les concentrats viraux sont obtenus par ultrafiltration de l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  au préalablement filtrée 0.2  $\mu\text{m}$  pour exclure les bactéries. L'ultrafiltrat (eau dépourvue de virus) a été utilisé pour réaliser une dilution au 1 /10 des communautés bactériennes côtières contenues dans l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  conservée. Les abondances virales dans le concentrat et l'ultrafiltrat ont été mesurées respectivement, afin de pouvoir calculer le facteur de concentration et de vérifier l'absence de virus.

Les échantillons d'eau de surface nécessaires pour les expériences à long terme ont été prélevés à la station A et E simultanément pendant les mois de février, mars, juin et juillet 2004. Quatre types de concentrats viraux correspondant à quatre traitements ont été réalisés :

un avec les virus du point E ( $V_E$ )

un avec les virus du point E inactivés ( $V_{E\text{inact}}$ )

un avec les virus du point A ( $V_A$ )

un avec les virus du point A inactivés ( $V_{A\text{inact}}$ )

L'inactivation des concentrats viraux, effectuée uniquement en juin et juillet, a été obtenue en utilisant un traitement aux micro-ondes (deux cycles de trois minutes à 800 W). Pour chaque traitement recevant l'addition de concentrat viral, un seul enrichissement viral théorique ( $\times 2$ ) de l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  diluée a été testé. Le calcul concernant le volume de concentrat viral à ajouter pour obtenir un facteur d'enrichissement théorique de  $\times 2$  est expliqué dans le paragraphe Matériels et Méthodes du chapitre précédent. Le cinquième traitement (Ec, contrôle) correspond à l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  diluée ne recevant pas de concentrat viral.

### 3.1.2. Assemblage des fractions

Les expériences de février et mars ont consisté en trois cultures en batch (deux traitements + un contrôle) réalisées en parallèle dans des Erlenmeyers de 5 l préalablement traités toute une nuit dans de l'acide (HCl 10 %) et rincés à l'eau MilliQ (Millipore). Les expériences de juin et juillet ont comporté 2 traitements supplémentaires correspondant à l'ajout de concentrats viraux inactivés. Après addition de 400 ml d'eau 0.8  $\mu\text{m}$  provenant de la station E dans chaque Erlenmeyer, entre 88 et 210 ml (en fonction du mois et du traitement) de concentrat viral ont été ajoutés dans deux (février et mars) ou quatre (juin et juillet) des Erlenmeyers afin d'obtenir un facteur enrichissement viral de  $\times 2$ . Le volume de tous les Erlenmeyers est finalement complété jusqu'à 4 l par addition d'eau ultrafiltrée (dépourvue de virus) provenant de la station E. Les filtrations ainsi que l'assemblage des différentes fractions s'est effectué à la température *in situ* et dans les 5 à 7 h suivant le prélèvement.

Les Erlenmeyers sont ensuite incubés pendant 90 h à l'obscurité, à la température *in situ* et sous faible agitation magnétique. En raison de volumes d'eau trop importants à filtrer pour obtenir chaque concentrat viral, les traitements n'ont pu être répliqués. Les expériences

ont donc été reconduites en février, mars, juin et juillet 2004 afin de vérifier si la réponse des communautés bactériennes aux enrichissements viraux était reproductible dans le temps.

### 3.1.3. Variables mesurées

L'ensemble des variables mesurées ainsi que les volumes prélevés et la fréquence des prélèvements sont répertoriés dans le Tableau 3.1. Le détail de toutes les méthodes de mesures utilisées se trouve dans la partie 2 de ce manuscrit.

Afin de conserver un volume d'eau suffisamment important pour permettre les mesures de diversité virale et bactérienne au terme de chaque expérience, seules les analyses demandant un faible volume d'échantillon ont été dupliquées. C'est le cas de la mesure des abondances virales et bactériennes par épifluorescence ainsi que des mesures réalisées en cytométrie de flux (abondance bactérienne, biovolumes bactériens et % HNA). En revanche, la mesure de la diversité génomique virale nécessitant une quantité importante d'eau, l'analyse de la structure initiale des communautés virales a été réalisée sur l'eau brute de la station E. Dans le troisième chapitre de la partie 3, il a été démontré qu'une filtration 0.2  $\mu\text{m}$  ne modifiait pas significativement la structure des communautés virales, nous avons donc considéré que la structure des communautés virales dans l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  diluée et celle de l'eau brute n'était pas différente. La dilution de l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  ayant été réalisée avec l'ultrafiltrat (< 2 nm), cette étape ne modifie pas non plus la structure des communautés virales, de même que celle des communautés bactériennes. Par contre cette étape divise par 10 la quantité de microorganismes et donc la quantité d'ADN disponible pour l'analyse de diversité bactérienne. C'est la raison pour laquelle, l'analyse de la structure initiale des communautés bactériennes servant de contrôle a été effectuée sur l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  non diluée.



Tableau 3.1: Ensemble des variables mesurées lors des expériences à long terme. Le volume d'échantillon nécessaire pour chaque analyse ainsi que la fréquence des prélèvements sont également reportés. A et E brut correspondent à l'eau brute respectivement de la station A et E. ME: microscopie en épifluorescence, PFGE : pulsed field gel electrophoresis, MET : microscopie électronique à transmission, CMF : cytométrie de flux, [<sup>3</sup>H] TdR: thymidine tritiée, PCR-SSCP : single strand conformational polymorphism – polymerase chain reaction, Spectro : spectrophotométrie. Ec, Ec+V<sub>E</sub>, Ec+V<sub>Einact</sub>, Ec+V<sub>A</sub> et Ec+V<sub>Ainact</sub> correspondent aux différents traitements. Les lettre f, m et j dans la ligne production représentent les mois où la mesure a été réalisée (respectivement février, mar et juin). Le volume restant dans les erlenmeyers avant les derniers prélèvements en 90 h était de 3310 ml soit 83 % du volume initial afin de limiter autant que faire ce peut l'effet de confinement.

			A brut	E brut	Eau 0.8µm	Ec, Ec+V <sub>E</sub> , Ec+V <sub>Einact</sub> , Ec+V <sub>A</sub> , Ec+V <sub>Ainact</sub>									
Variables	Techniques	Volumes				t <sub>0</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>12</sub>	t <sub>18</sub>	t <sub>30</sub>	t <sub>42</sub>	t <sub>54</sub>	t <sub>66</sub>	t <sub>78</sub>	t <sub>90</sub>
Abondance virale et bactérienne	ME	2 ml	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Diversité virale	PFGE		10 l	15 l											2.5 l
	MET	219 ml	✓	✓											✓
Abondance bactérienne	CMF	3 ml	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Biovolumes bactériens															
% HNA															
Production bactérienne	[ <sup>3</sup> H] TdR	80 ml	✓	✓		f, m, j	f		f, m, j	j	f, m		m		j
Diversité bactérienne	SSCP-PCR	300 ml	✓	✓	✓										✓
Sels nutritifs	Colorimétrie	70 ml	✓	✓		✓			✓		✓		✓		✓
COD	Spectro														

La mortalité bactérienne en 6 ou 18 h consécutive aux enrichissements viraux a été calculée de la manière suivante :

$$M_b = 100 \times ((C_{bEccorr} - C_{bEX}) / C_{bEccorr})$$

où  $C_{bEccorr}$  représente l'abondance bactérienne dans le contrôle en 6 ou 18 h corrigée pour la différence initiale d'abondance bactérienne entre le contrôle et le traitement pour lequel doit être déterminé le taux de mortalité,  $C_{b_{0Ec}}$  représente l'abondance bactérienne initiale dans le contrôle et  $C_{bEX}$  correspond à l'abondance bactérienne en 6 ou 18 h dans le traitement.  $M_b$  représente aussi le pourcentage de différence dans la production cellulaire en 6 ou 18 h par rapport à Ec (Almeida et al. 2001b).

### 3.1.4. Statistiques

Pour chaque expérience, afin d'analyser la différence de composition des communautés bactériennes, une matrice de présence – absence incluant dans chaque ligne les pics détectés par PCR-SSCP pour un traitement donné a été créée. Cette matrice a été utilisée pour calculer une matrice de similarité (coefficient de Dice) permettant la construction d'un dendrogramme par la méthode UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages).

Une autre matrice contenant la contribution relative de chaque pic à l'intensité totale d'un traitement (abondance relative) a été utilisée pour calculer l'indice de diversité de Shannon ( $H'$ ) pour chaque traitement selon la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \log p_i$$

où  $k$  est le nombre de pics dans un traitement et  $p_i$  l'abondance relative de chaque pic.  $H'$  étant sensible à la variation de  $k$ , nous avons préféré calculer  $J'$  qui correspond à l'homogénéité ou à la diversité relative :

$$J' = H' / H'_{\max}$$

où  $H'_{\max}$  est égal à  $\log(k)$ . Les résultats étant discutés dans le cadre de la théorie du "Killing the winner", nous avons utilisé l'hétérogénéité ou dominance ( $1-J'$ ) comme indice de diversité.

Tableau 3.2: Paramètres microbiens et environnementaux mesurés sur les eaux brutes de la station A et E. DIN : azote inorganique dissous, PO4 : phosphates, COD : carbone organique dissous, T : température. En raison de problèmes logistiques, certaines valeurs sont manquantes.

Mois	Stations	Abondance virale ( $\times 10^7$ PAV ml <sup>-1</sup> )	Abondance bactérienne ( $\times 10^6$ cell ml <sup>-1</sup> )	Production bactérienne ( $\times 10^6$ cell ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	DIN ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	PO4 ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	COD ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	T <i>in situ</i> (°C)
Février	E	1.23	1.46	8.44	51	0.48	96	7.5
Mars	A	2.02	3.44		510	1.53	255	11
	E	1.33	2.41	24.19	55	2.29	85	9.6
Juin	A	4.64	6.39		302	2.98	220	17
	E	3.10	5.16	45.88	36	0.48	96	16.6
Juillet	A	9.20	8.16		415	1.44	164	21
	E	4.00	5.56		18	0.56	102	20.2

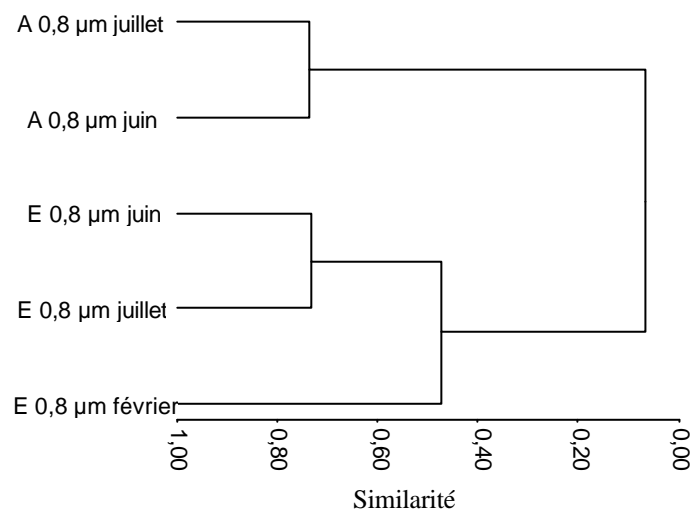


Figure 3.1.: Dendrogramme réalisé sur la matrice de similarité (coefficient de Dice, lien complet) obtenue à partir des profils de PCR-SSCP des eaux 0.8 µm de la station A (juin et juillet 2004) et E ( février, juin et juillet 2004). Les profils manquants n'ont pu être obtenus en raison d'une inhibition de l'étape d'amplification.

La comparaison de la structure des communautés virales initiales données par PFGE a été effectuée de la même manière que la comparaison de la composition des communautés bactériennes (i.e. construction d'une matrice de similarité à partir de laquelle est créé un dendrogramme par la méthode UPGMA).

Les variations spatio-temporelles et inter traitements respectivement dans la structure morphométrique des communautés virales initiales et dans celle des communautés virales en 90 h ont été testées par l'analyse du Chi carré des tables de contingences (Zar 1999). Les structures morphométriques des communautés virales ont été ensuite comparées en appliquant une analyse factorielle des correspondances (AFC) aux abondances relatives de chaque classe de taille de capsides. Une classification ascendante hiérarchique (CAH, méthode de Ward) a ensuite été appliquée aux coordonnées de chaque échantillon dans les deux premiers axes de l'AFC pour construire un dendrogramme.

## 3.2. Resultats

### 3.2.1. Caractéristiques du milieu

Les températures de surface au niveau de chaque station suivent un schéma saisonnier classique avec des valeurs augmentant de février à juillet (Tableau 3.2). Les abondances virales et bactériennes varient respectivement de  $1.33 \times 10^7$  à  $9.20 \times 10^7$  PAV  $\text{mL}^{-1}$  et de  $1.49 \times 10^6$  à  $8.16 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1}$  avec des valeurs légèrement plus élevées à la station A qu'à la station E. Les abondances microbiennes présentent également des valeurs plus élevées durant les expériences d'été que celles d'hiver. La production bactérienne cellulaire suit la même tendance avec des valeurs partant de  $8.44 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  pour l'expérience de février et atteignant la valeur de  $45.88 \times 10^6$  cell  $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  pour l'expérience de juin. Les concentrations en DIN et COD varient respectivement de 18 à 510  $\mu\text{mol l}^{-1}$  et de 85 à 255  $\mu\text{mol l}^{-1}$  avec des valeurs respectivement 10 et 2 fois (en moyenne) plus faible à la station E qu'à la station A. Ces variables suivent une évolution inverse de celle des variables microbiennes avec une diminution notable entre les expériences d'hiver et d'été. Les concentrations en phosphates varient de 0.48 à 2.98  $\mu\text{mol l}^{-1}$  sans tendance spatiale ou saisonnière particulière. Globalement, toutes ces variables correspondent aux valeurs retrouvées dans la dynamique spatio-temporelle précédemment décrite (Partie 3, chapitre 2).

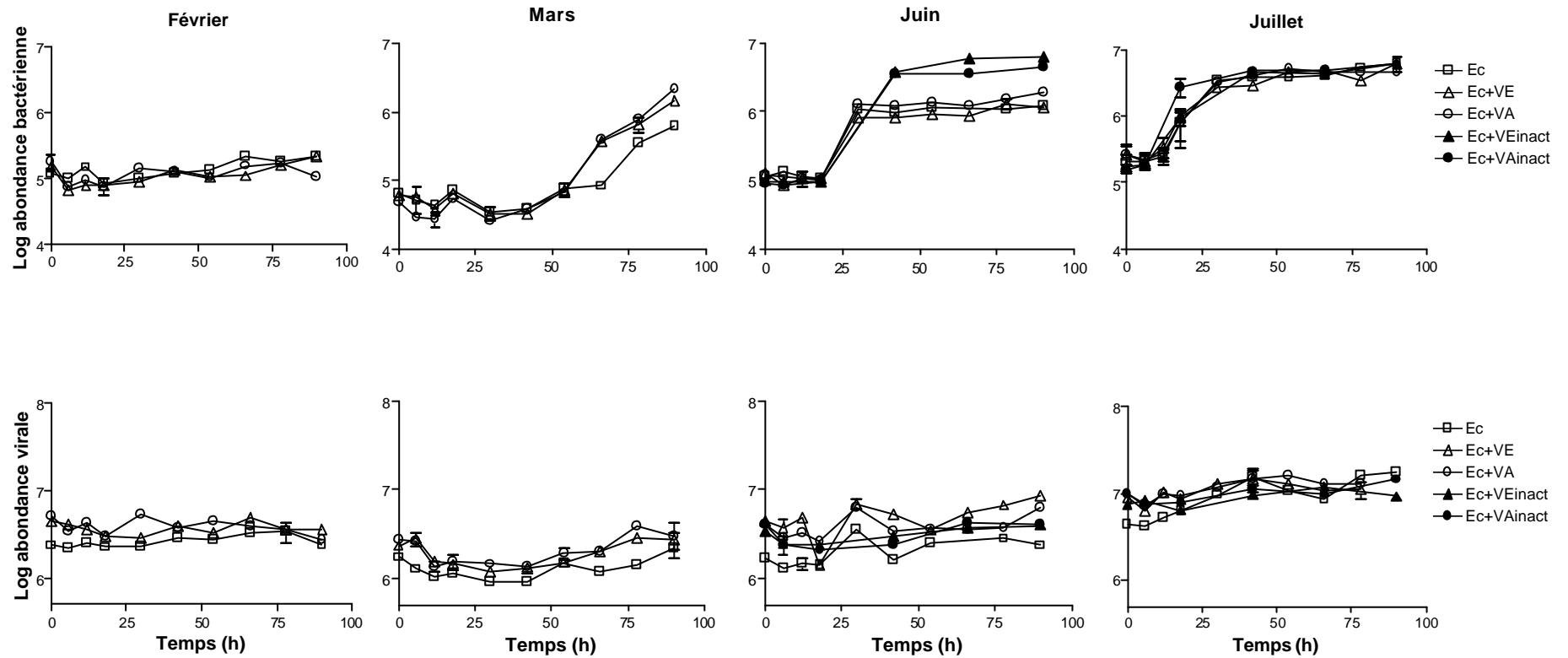


Figure 3.2: Evolution des abondances bactériennes et virales (exprimée Log [abondance ml<sup>-1</sup>]) dans chaque traitement pour les expériences de février, mars, juin et juillet 2004. Les barres d'erreur correspondent à  $\pm 1$  fois l'écart moyen.

La présence d'inhibiteur de l'étape d'amplification n'a pas permis d'obtenir un profil des communautés bactériennes dans les eaux brutes. Une analyse de similarité appliquée aux profils obtenus sur les eaux 0.8  $\mu\text{m}$  de la station A et E par la technique de PCR-SSCP regroupe les échantillons par station (Figure 3.1). La composition des communautés bactériennes dépend donc plus de la station de prélèvement que de la date même si l'échantillon de février de la station E semble montrer qu'une saisonnalité existe au niveau de chaque site. Il est tout de même important de noter que 50 % (9 phylotypes) des espèces détectées dans la rivière le sont également dans le bassin. La richesse spécifique est supérieure dans le bassin avec en moyenne 26 espèces détectées contre 19 dans la rivière. De plus, la dominance mesurée pour les mois d'été à la station E (0.105) est deux fois plus faible que celle observées pour les mois d'été à la station A (0.214).

### 3.2.2. Dynamique des abondances microbiennes

L'évolution des abondances bactériennes est typique d'une cinétique de croissance bactérienne classique avec la présence d'une phase de latence dont la durée se raccourcit de février à juillet, d'une phase de croissance exponentielle (excepté en février) et d'une phase stationnaire de croissance uniquement visible en 90 h durant les expériences d'été (juin et juillet) (Figure 3.2). Une durée d'expérience de 90 h n'a pas permis l'établissement d'une phase de croissance exponentielle en février. De fait, c'est en février que l'augmentation de biomasse ( $\times 1.3 \pm 0.5$ , moyenne pour tous les traitements), les taux de croissance ( $0.10 \pm 0.05 \text{ j}^{-1}$ , calculés entre 18 et 90 h) et le nombre de générations en 90 h ( $0.4 \pm 0.2$ ) sont les plus faibles (Figure 3.3A). C'est en juin que les taux de croissance (mesurés pendant la phase de croissance exponentielle) sont les plus forts avec une valeur moyenne de  $1.82 \pm 0.25 \text{ j}^{-1}$  ce qui correspond à une moyenne de  $6.9 \pm 1.0$  générations en 90 h (Figure 3.3A). En juin, l'augmentation de la biomasse bactérienne est significativement plus importante dans les traitements contenant les virus inactivés que dans les autres traitements (Figure 3.3B). La même remarque peut être faite en mars pour les traitements  $\text{Ec}+\text{V}_\text{E}$  et  $\text{Ec}+\text{V}_\text{A}$  ; dans ce cas, la plus forte augmentation de biomasse est due à des taux de croissance plus élevés que dans le contrôle (Figure 3.3B).

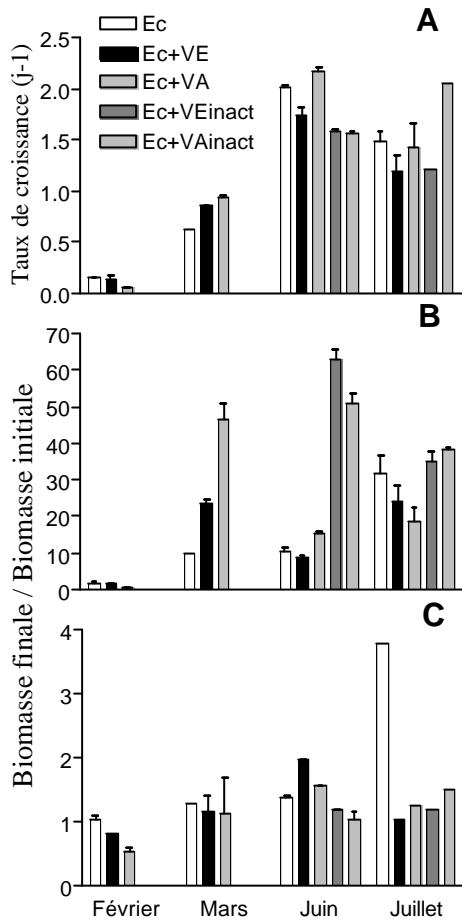


Figure 3.3: A : Taux de croissance bactérienne mesuré pendant la phase de croissance exponentielle (excepté en février où il est mesuré entre 18 et 90 h). B et C: Rapport de la biomasse à t<sub>0</sub> sur la biomasse à t<sub>90</sub> respectivement pour les bactéries et les virus. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart moyen.

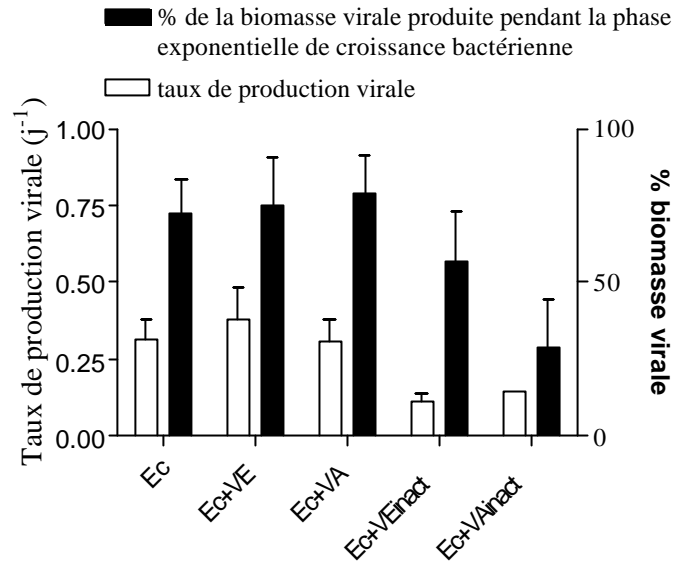


Figure 3.4: Taux de production virale et pourcentage de la biomasse virale produite pendant la phase de croissance exponentielle dans chaque traitement. La barre d'erreur correspond à l'écart type pour les quatre expériences.

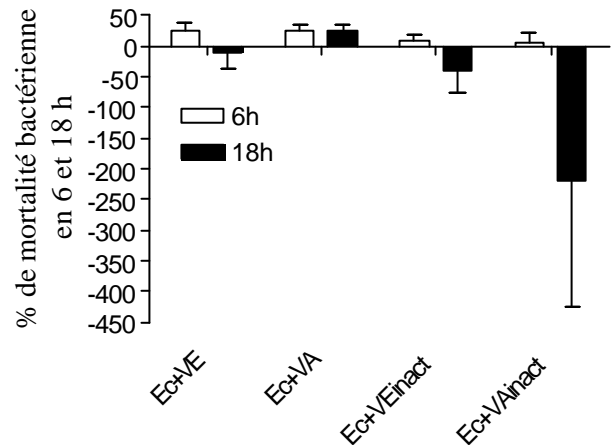


Figure 3.5: Taux apparent de mortalité bactérienne après 6 et 18 h obtenu pour chaque traitement par rapport au contrôle. La barre d'erreur représente l'écart type pour les quatre expériences.

Comme attendu, les abondances virales initiales dans les cultures enrichies en concentrat viral sont significativement plus élevées ( $p < 0.05$ ) que dans les cultures contrôles (Figure 3.2) avec un enrichissement viral observé de  $2.1 \pm 0.3$  (moyenne pour tous les traitements et toutes les expériences). Excepté en juillet et lors de quelques occasions ponctuelles, les abondances virales du contrôle restent inférieures à celles observées dans les cultures enrichies. Dans l'ensemble et contrairement aux bactéries, il n'y a pas eu d'importante production de biomasse virale en 90 h de cultures comme l'indique les faibles rapports biomasse finale / biomasse initiale (Figure 3.3C) et la diminution du VBR ( $91 \pm 5 \%$  pour mars, juin et juillet et  $32 \pm 17 \%$  pour février). De plus, peu de différences sont observables entre les traitements si ce n'est une biomasse virale produite en 90 h 3 fois plus importante que la moyenne générale dans le contrôle de juillet.

Au cours des 90 h de culture, les abondances virales présentent de nombreuses oscillations pouvant être assimilées à des cycles de production – mortalité. Le calcul des taux de production virale pour chaque traitement (moyenne des quatre expériences) met en évidence des taux de production significativement plus faibles ( $p < 0.05$ ) dans les traitements contenant les virus inactivés (Figure 3.4). La majorité de la biomasse virale produite pendant les cultures ( $72 \pm 20 \%$ ) s'effectue pendant la phase de croissance exponentielle des bactéries, excepté pour le traitement  $Ec+V_{Ainact}$  où seulement  $28 \pm 16 \%$  de la biomasse virale est produite durant cette période (Figure 3.5).

Dans les six premières heures de culture, la mortalité bactérienne par lyse virale est plus faible dans le contrôle et les traitements contenant les virus inactivés ( $6 \pm 15 \%$ ) que dans les traitements  $Ec+V_E$  et  $Ec+V_A$  ( $25 \pm 21 \%$ ) (Figure 3.5). En 18 h, excepté dans le traitement  $Ec+V_A$ , l'addition de virus actifs ou inactifs semble plutôt stimuler la croissance bactérienne par rapport au contrôle (Figure 3.5).



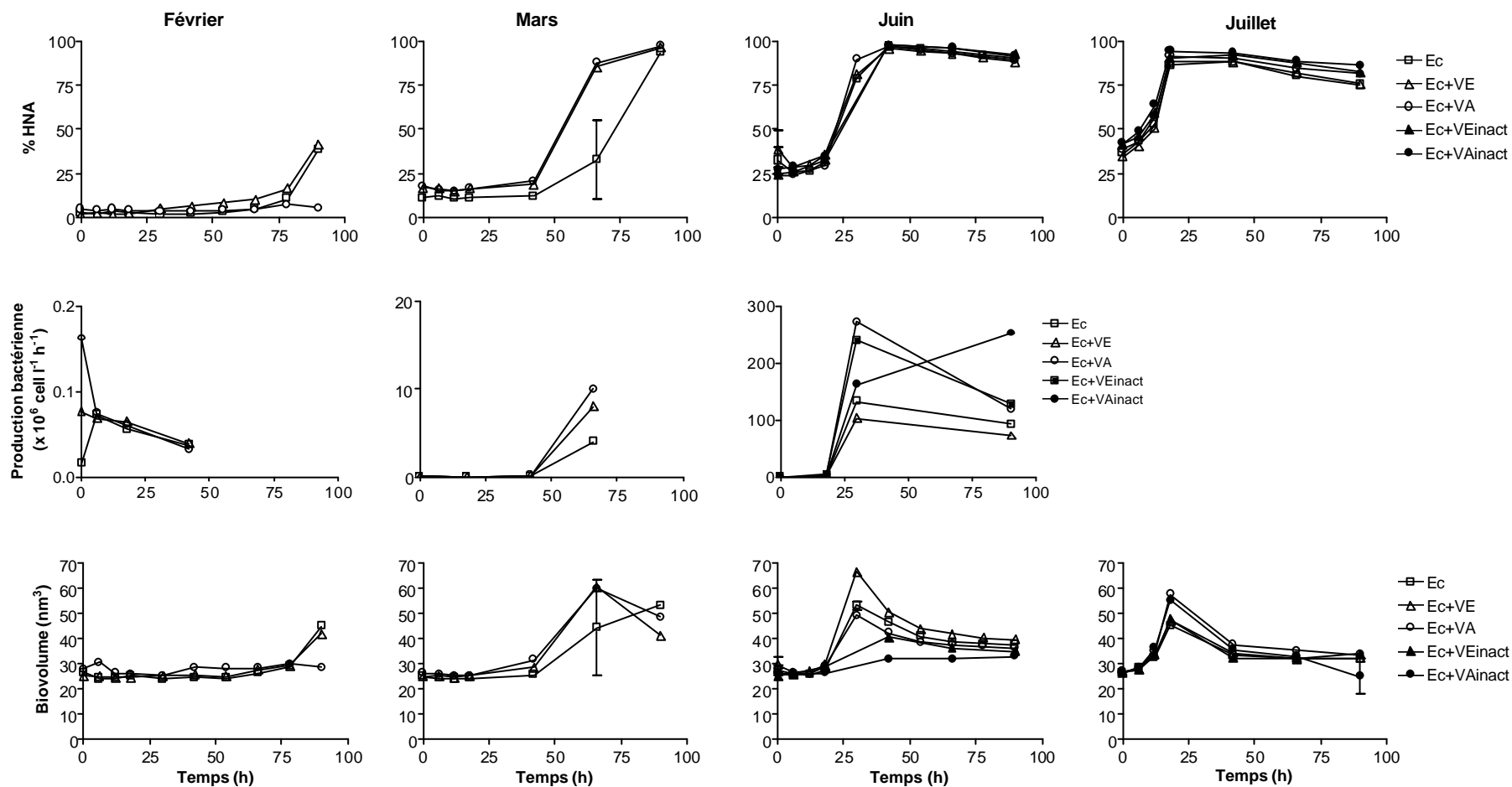


Figure 3.6: Evolution des paramètres bactériens dans chaque traitement pour les expériences de février, mars, juin et juillet 2004. Les barres d'erreur correspondent à  $\pm 1$  fois l'écart moyen. Pour des raisons de logistique, les valeurs de production n'ont pu être mesurées en juillet 2004.

### 3.2.3. Dynamique des paramètres bactériens

Au cours des cultures, deux sous populations bactériennes ont pu être distinguées sur les cytogrammes (Figure 3.7).

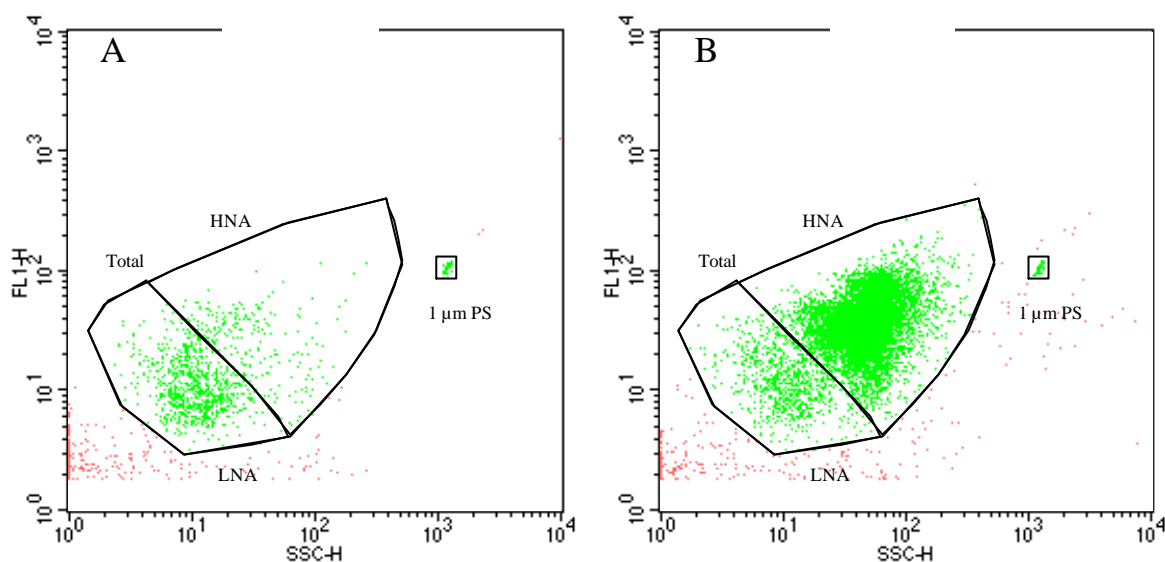


Figure 3.7: Exemple de cytogrammes obtenus à 0 (A) et 90 h (B) pour le contrôle en mars 2004. FL1H correspond à la fluorescence et SSCH (Side Scatter) correspond à la granulométrie et constitue notre estimateur de biovolume. Les sous populations à basse (LNA) et haute (HNA) quantité d'ADN sont délimitées par des fenêtres.

La première sous population, dominante à l'état initial dans chaque traitement de chaque expérience, correspond à des bactéries présentant une faible fluorescence et un faible biovolume et elle est qualifiée de sous population à basse quantité d'ADN (LNA). La deuxième sous population, apparaissant au moment de la phase de croissance exponentielle bactérienne et déclinant lentement pendant la phase stationnaire (Figure 3.6), correspond à des bactéries présentant une fluorescence et un biovolume plus important que ceux de la première sous population et elle est qualifiée de sous population à haute quantité d'ADN (HNA).

Après 90 h de culture dans les expériences où s'est développée une phase de croissance exponentielle (mars, juin et juillet), les sous populations HNA représentent en moyenne  $88 \pm 7\%$  des bactéries contre  $29 \pm 10\%$  à l'état initial (Figure 3.6). Les dynamiques des sous populations HNA correspondent aux dynamiques des abondances bactériennes, et à l'instar de celles-ci, présentent peu de différences entre les différents traitements.

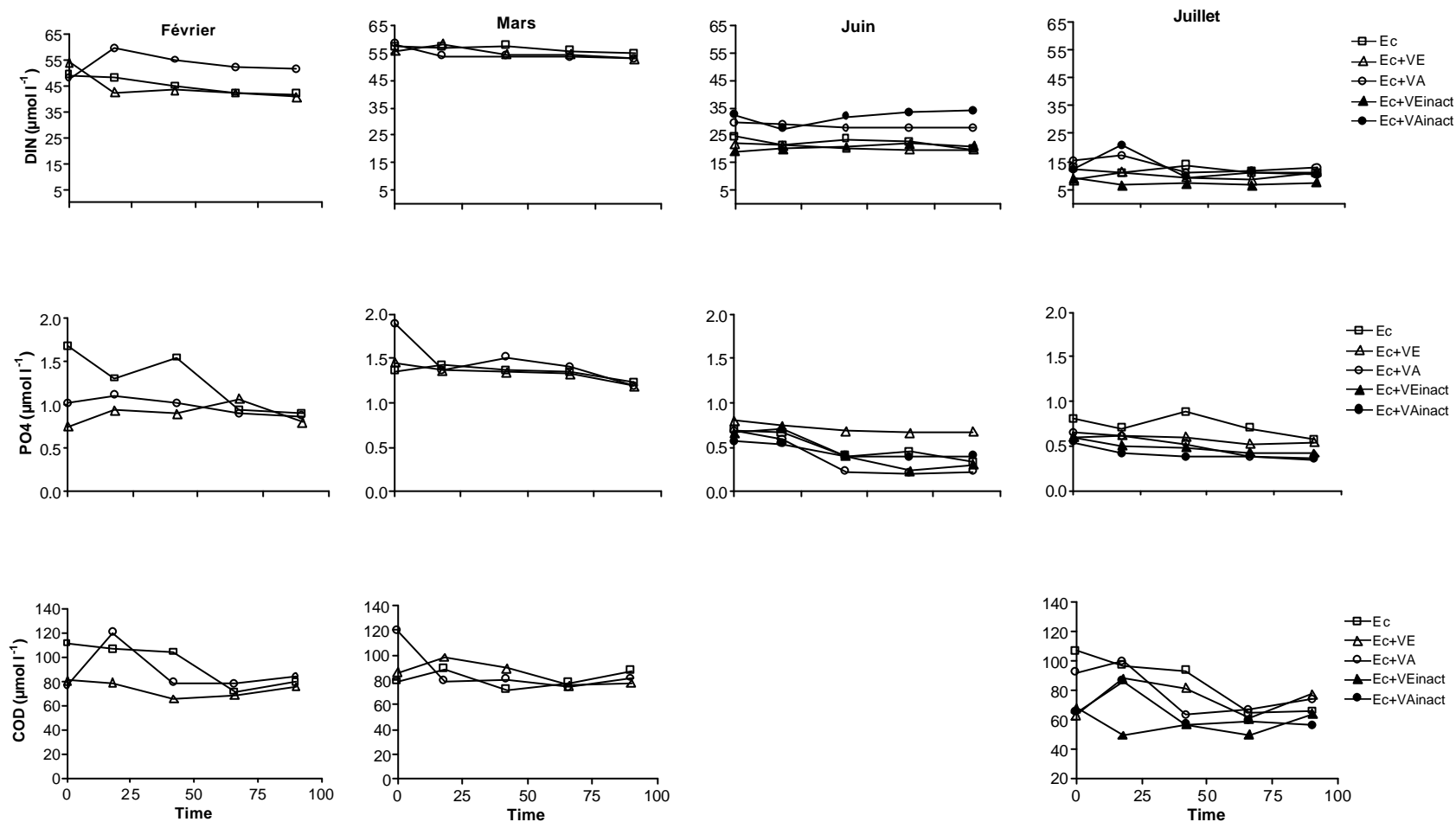


Figure 3.8: Evolution des sels nutritifs dans chaque traitement pour les expériences de février, mars, juin et juillet 2004. Il n'a pas été possible de mesurer les concentrations en COD en juin 2004.

La production bactérienne présente une importante dépendance vis à vis de la température avec des valeurs multipliées en moyenne par 1000 entre les expériences de février et de juin (Figure 3.6). L'évolution des productions correspond à la dynamique observée pour les abondances bactériennes avec des pics de production au moment de la croissance exponentielle. En mars, tout comme les observations réalisées pour les abondances bactériennes et le %HNA, l'addition de virus semble avoir stimulé la production en comparaison de celle du contrôle (Figure 3.6). La même observation peut être faite en juin pour les traitements  $Ec+V_A$ ,  $Ec+V_{Einact}$  et  $Ec+V_{Ainact}$  avec une production qui continue d'augmenter après 30 h pour ce dernier alors que toutes les autres déclinent.

Contrairement à la production, les biovolumes ne semblent pas être dépendants de la température puisqu'ils sont identiques à l'état initial de chaque expérience ( $27 \pm 1 \text{ nm}^3$ ) (Figure 3.6). Ces biovolumes bactériens doublent ( $51 \pm 10 \text{ nm}^3$ , moyenne pour tous les traitements en mars, juin et juillet) en fin de croissance exponentielle et reviennent à un niveau intermédiaire pendant la phase stationnaire ( $34 \pm 4 \text{ nm}^3$ , moyenne pour tous les traitements en juin et juillet). Les différences entre les traitements correspondent à celle déjà observées pour les autres paramètres bactériens.

#### 3.2.4. Evolution des concentrations en sels nutritifs et du COD

Les faibles concentrations en phosphates et les rapports DIN :  $PO_4$  élevés ( $41 \pm 14$ ) au début de chaque expérience sont indicateurs de conditions potentiellement limitantes en phosphore. De plus les concentrations initiales en DIN et  $PO_4$  sont divisées par 2 entre les expériences d'hiver et d'été (Figure 3.8). Nos expériences étant basées sur l'addition de concentrats, nous pouvions craindre un enrichissement en sels nutritifs et COD dans les traitements recevant les concentrats par rapport au contrôle. Ceci est d'autant plus vrai pour les concentrats réalisés avec l'eau de la station A dont les eaux brutes présentent des concentrations en DIN et COD respectivement 10 et 2 fois plus élevées qu'à la station E. D'après les résultats, ce phénomène n'apparaît que légèrement en juin où les concentrations en DIN dans les traitements  $Ec+V_A$  et  $Ec+V_{Ainact}$  sont plus élevées ( $29 \pm 3 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) que dans les autres traitements ( $21 \pm 2 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) et en mars où les concentrations initiales en  $PO_4$  et COD dans le traitement  $Ec+V_A$  sont nettement supérieures à celles mesurées dans le contrôle.

Tableau 3.3: Coefficient de corrélation (r, Pearson) entre les abondances microbiennes (bactéries et virus) et les différents paramètres (%HNA, biovolume bactérien, production bactérienne, sels nutritifs et COD) mesurés dans tous les traitements de chaque expérience. COD : carbone organique dissous, DIN : azote inorganique dissous, PO<sub>4</sub> : phosphate inorganique.

	Février		Mars		Juin		Juillet	
	Bactérie	Virus	Bactérie	Virus	Bactérie	Virus	Bactérie	Virus
Bactérie				0.771**		0.623*		0.611*
%HDNA	0.640**		0.976***	0.633*	0.940***	0.664*	0.528*	
Biovolume	0.671**		0.920***					
Production			0.958***		0.781**			
COD	-0.518*	-0.594*					-0.467*	
DIN			-0.592*					
PO <sub>4</sub>					-0.803***		-0.506*	

\*\*\* : p < 0.001

\*\* : p < 0.01

\* : p < 0.05

Tableau 3.4: Coefficients de détermination (R<sup>2</sup>) obtenus par des régressions linéaires simples entre les abondances bactériennes et les abondances virales (Log [abondance virale]) = f (Log [abondance bactérienne]). p correspond à la probabilité. Les valeurs de R<sup>2</sup> en gras représentent les régressions significatives.

	Février		Mars		Juin		Juillet	
	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p	R <sup>2</sup>	p
Ec	<b>0.45</b>	0.034	<b>0.60</b>	0.009	<b>0.64</b>	0.01	<b>0.87</b>	<0.001
Ec+V <sub>E</sub>	0.03	0.595	<b>0.47</b>	0.029	<b>0.40</b>	0.05	<b>0.57</b>	0.019
Ec+V <sub>A</sub>	0.26	0.144	<b>0.45</b>	0.034	0.35	0.072	<b>0.76</b>	0.002
Ec+V <sub>Einact</sub>					0.55	0.094	0.40	0.180
Ec+V <sub>Ainact</sub>					0.16	0.75	0.28	0.282

Dans l'ensemble, les concentrations en DIN varient très peu au cours des expériences quelque soit le traitement. Les concentrations en phosphate présentent un peu plus de variations notamment en février où la concentration en  $\text{PO}_4$  décroît dans le contrôle au cours des 90 h alors que dans les autres traitements, elle reste stable. En juin, une diminution des concentration en  $\text{PO}_4$  est notable pendant la croissance exponentielle bactérienne (18- 42 h). Malgré de nombreuses oscillations, les concentrations en COD présentent une tendance générale à la décroissance en 90 h pour tous les traitements et toutes les expériences. Cette tendance est notamment visible en juillet entre 18 et 66 h (Figure 3.8).

### 3.2.5. Relations entre abondances microbiennes et paramètres biotiques / abiotiques

De nombreuses variables étant dépendantes de la température ou de la saison, les relations inter paramétriques dans une matrice globale (réunissant les quatre expériences) auraient pu être faussées par ces effets température ou saison. C'est la raison pour laquelle une matrice de corrélation multiple a été créée pour chaque expérience. Dans chaque expérience, les abondances bactériennes sont corrélées au %HNA et à la production en mars et juin (la relation n'a pas été testée en hiver, Tableau 3.3). Les abondances bactériennes sont également corrélées significativement dans trois expériences sur quatre (mars, juin et juillet) aux abondances virales. Enfin, dans chaque expérience, les abondances bactériennes se retrouvent corrélées négativement à au moins un des sels nutritifs (DIN [mars] et  $\text{PO}_4$  [juin et juillet]) ou au COD (février et juillet). Outre leur relation avec les abondances bactériennes, les virus sont corrélés avec le %HNA en mars et juin.

Sur l'ensemble des expériences, les abondances bactériennes sont le principal paramètre expliquant la dynamique des abondances virales. Les abondances bactériennes dans le traitement Ec expliquent à elles seules entre 45 et 87 % de la variabilité des abondances virales. (Tableau 3.4). Les valeurs de  $R^2$  dans les traitements Ec +  $\text{VE}$  et Ec +  $\text{VA}$  sont pour chaque expérience inférieur au  $R^2$  du contrôle correspondant. En février, seul le contrôle présente une relation significative ( $p < 0.05$ ) entre abondances bactériennes et virales. De plus, aucune relation significative n'a pu être obtenue dans les traitements contenant les virus inactivés.

### 3.2.6. Influence des traitements sur la composition de la communauté bactérienne

#### 3.2.6.1. Effet de la croissance naturelle des bactéries et du confinement

Les modifications observées entre l'état initial et l'état final (au bout de 90 h) des communautés bactériennes sont plus importantes que celles observées entre les différents traitements. Les empreintes génétiques données par l'analyse PCR-SSCP montrent pour toutes les expériences une nette réduction de la richesse spécifique ( plus importante en février [ $- 65 \pm 15 \%$ ] qu'en été [ $- 22.5 \pm 5 \%$ ], Figure 3.9) et une augmentation de la dominance (1-J') dans tous les traitements et le contrôle en comparaison avec la situation initiale. Les analyses de similitudes confirment ces changements puisque les structures des communautés bactériennes initiales sont celles qui présentent le moins de similitudes avec les différentes communautés obtenues en 90 h (Figure 3.9 et 3.10). Ces changements observés dans la communauté bactérienne au cours des 90 h de cultures sont dus à la dynamique de deux groupes de phylotypes bactériens identifiables sur les profils PCR-SSCP (Figure 3.9). Avec  $66 \pm 11 \%$  de l'abondance relative totale, le groupe A domine la communauté bactérienne à l'état initial dans toutes les expériences. Cette tendance s'inverse en 90 h dans tous les traitements et au cours de chaque expérience au profit du groupe B qui domine largement ( $74 \pm 11 \%$  de l'abondance relative totale) la communauté bactérienne. Cette évolution s'accompagne de la disparition (essentiellement en février et en juin) ou de la diminution de l'abondance relative (essentiellement en juillet) de phylotypes du groupe A et d'un important développement de quelques phylotypes du groupe B présentes dans la structure initiale mais non dominantes.

#### 3.2.6.2. Effets des différents enrichissements viraux sur la structure des communautés bactériennes

Comme le montre les dendrogrammes de similarité, même si la principale différence entre la composition des communautés bactériennes se situe entre les états initiaux et finaux, des différences ont pu être détectées entre les traitements (Figure 3.9 et 3.10).

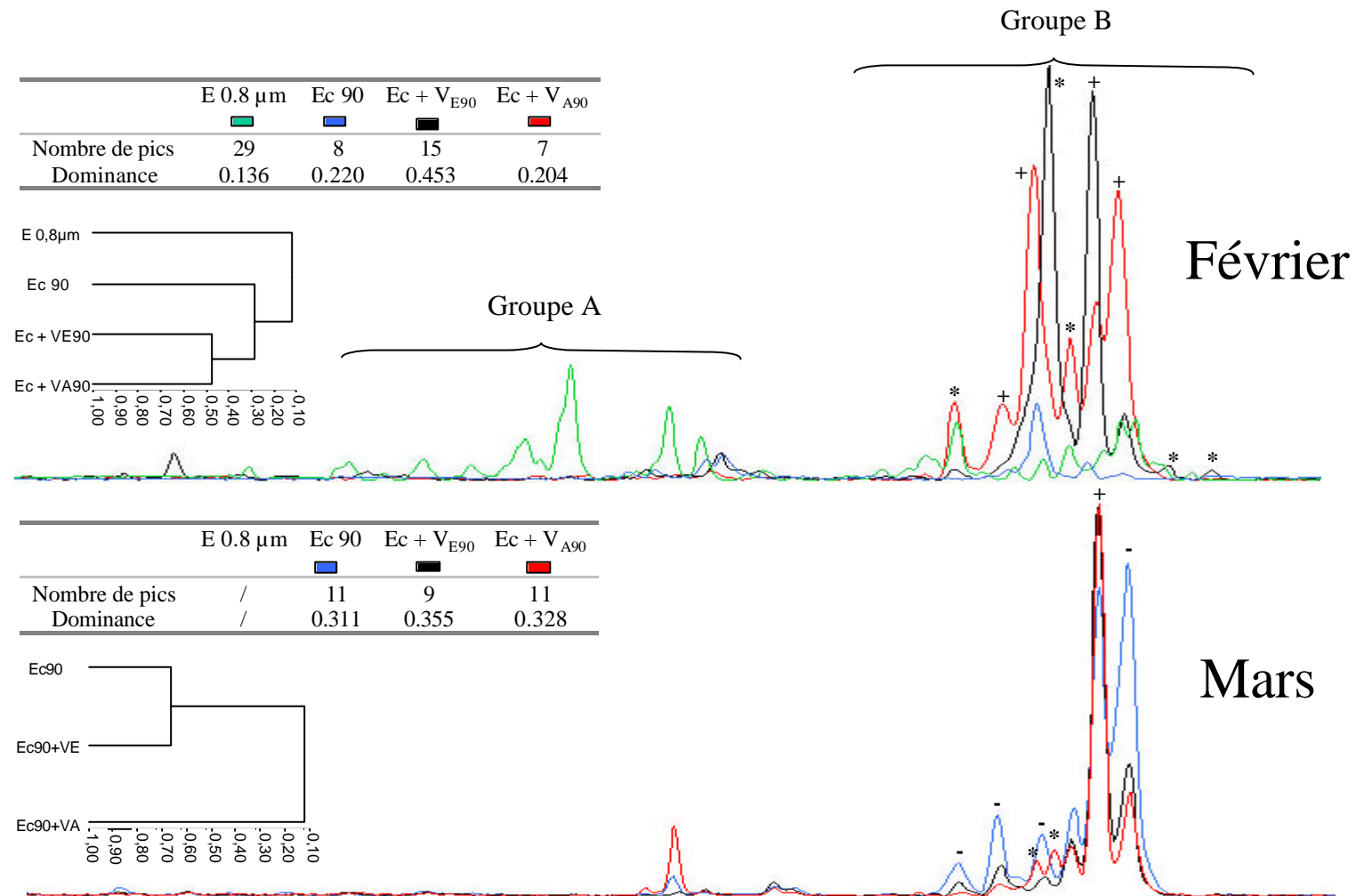


Figure 3.9 : Profil SSCP d'ADNr 16S des communautés bactériennes de chaque traitement pour les expériences de février et mars 2004. Les symboles plus et moins correspondent respectivement aux principaux pics augmentant et régressant dans les deux traitements par rapport au contrôle, les étoiles correspondent aux pics absents dans le contrôle et / ou l'eau 0.8  $\mu\text{m}$ . En mars, il n'a pas été possible d'obtenir un profil SSCP de l'eau 0.8  $\mu\text{m}$ . Sur chaque profil est aussi reporté dans un tableau le nombre de pics ainsi que la valeur de dominance pour chaque traitement. Enfin, l'analyse de similarité de composition des communautés est illustrée par un dendrogramme.



En février, les compositions des différentes communautés observées dans les Erlenmeyers enrichis en virus présentent la plus forte similarité (0.48, Figure 3.9). De plus, ces enrichissements viraux provoquent l'évolution de structures différentes à celle observée dans le contrôle, avec l'apparition de nouveaux phylotypes et un important développement de certains phylotypes du groupe B. En conséquence de plus fortes valeurs de dominance (0.45) et de richesse spécifique (15) caractérisent le traitement Ec+V<sub>E</sub> par rapport au contrôle (respectivement 0.136 et 8).

En mars, il n'a pas été possible d'obtenir une empreinte de la communauté bactérienne à l'état initial. L'analyse de similitude montre très peu de différences dans la composition des communautés bactériennes entre le contrôle et le traitement Ec+V<sub>E</sub> (valeur de similitude de 0.68). La communauté bactérienne du traitement Ec+V<sub>A</sub> se distingue par l'apparition de deux nouveaux phylotypes. De plus, l'abondance relative des phylotypes du contrôle est toujours supérieure à celle des phylotypes des traitements Ec+V<sub>E</sub> et Ec+V<sub>A</sub>, excepté pour un phylotype qui à lui seul représente plus de 50% de l'abondance relative. Ceci entraîne une valeur de dominance plus importante que dans le contrôle (Figure 3.9).

En juin, après 90 h de culture, la composition des communautés bactériennes présente peu de différences entre les différents traitements comme indiqué par les fortes valeurs de similitudes obtenues (Figure 3.10). Ces communautés sont toutes dominées par la même population bactérienne qui dominait les assemblages bactériens dans les traitements Ec+V<sub>E</sub> et Ec+V<sub>A</sub> en mars. Les Erlenmeyers enrichis avec des concentrats viraux inactivés présentent les valeurs de richesse les plus faibles avec une valeur de dominance maximale pour le traitement Ec+V<sub>A</sub>.

Contrairement à juin, en juillet la composition des communautés bactériennes présente de fortes modifications entre les traitements et le contrôle. Chaque type de concentrat viral (dulçaquicole ou côtier), qu'il ait été inactivé ou non, semble avoir eu sa propre influence sur la composition des communautés bactériennes puisque les valeurs de similitude les plus élevées sont obtenues entre les traitements Ec+V<sub>E</sub> et Ec+V<sub>E</sub><sub>inact</sub> (0.79) et entre Ec+V<sub>A</sub> et Ec+V<sub>A</sub><sub>inact</sub> (0.67) (Figure 3.10). Cette différence se caractérise par la présence de cinq phylotypes caractéristiques des traitements Ec+V<sub>E</sub> et Ec+V<sub>E</sub><sub>inact</sub> et de trois phylotypes caractéristiques des traitements Ec+V<sub>A</sub> et Ec+V<sub>A</sub><sub>inact</sub>.

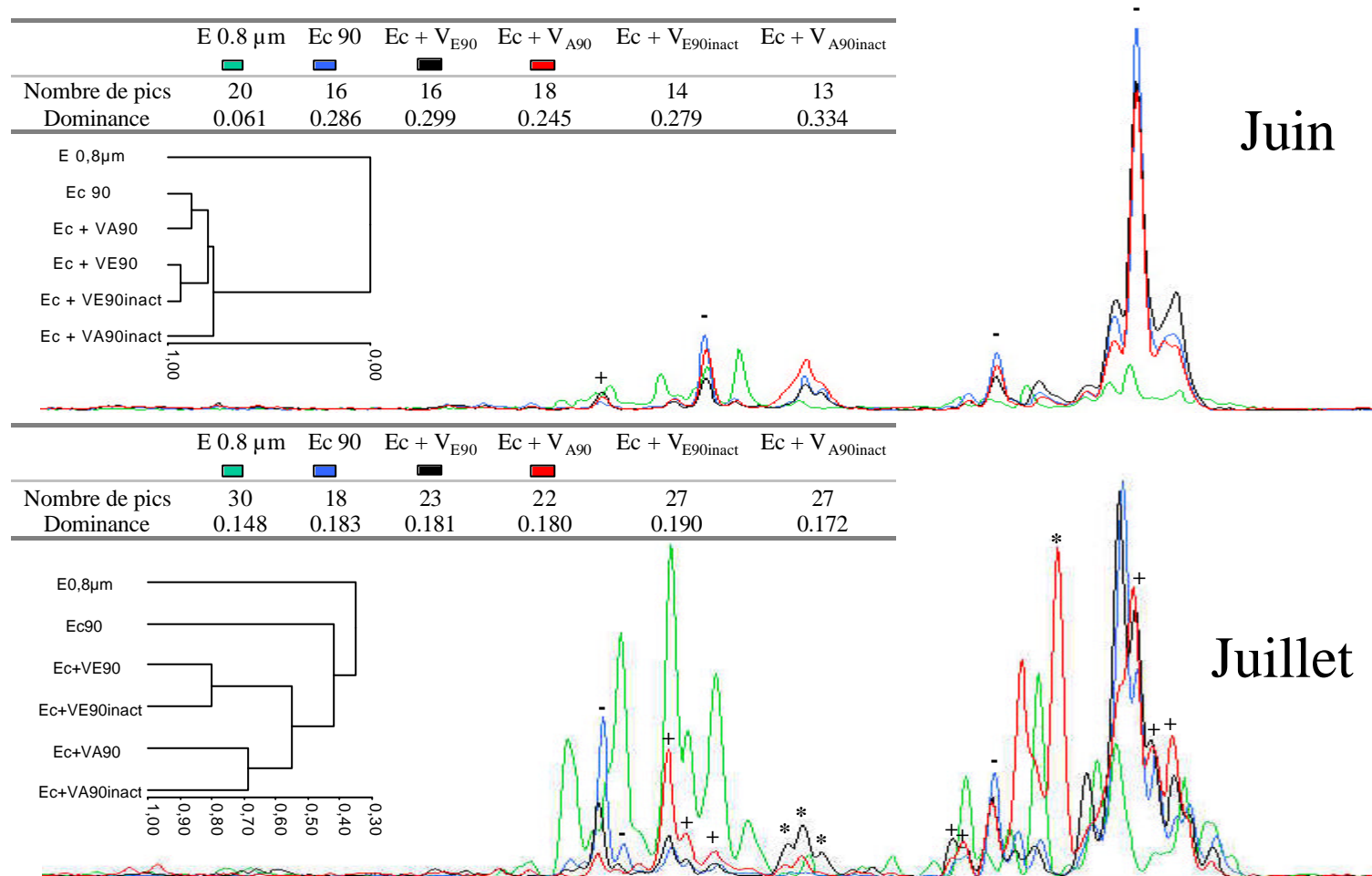


Figure 3.10: Profil SSCP d'ADNr 16S des communautés bactériennes de chaque traitement pour les expériences de juin et juillet. Les symboles plus et moins correspondent respectivement aux principaux pics augmentant et régressant dans les deux traitements par rapport au contrôle, les étoiles correspondent aux pics absents dans le contrôle et / ou l'eau 0.8  $\mu\text{m}$ . Pour une meilleure lecture, les profils des traitements Ec + V<sub>Einact</sub> et Ec + V<sub>Ainact</sub> ne figurent pas sur ces graphes. Sur chaque profil est reporté dans un tableau le nombre de pics ainsi que la valeur de dominance pour chaque traitement. Enfin, l'analyse de similarité de composition des communautés est illustrée par un dendrogramme.

La richesse spécifique est également plus forte dans les différents traitements que dans le contrôle. Les valeurs de dominance restent quant à elles très proches entre les traitements et le contrôle. Ces valeurs de dominance sont plus faibles que dans les expériences précédentes en raison d'un maintien d'un plus grand nombre de populations du groupe A après 90 h de culture.

### 3.2.7. Influence des traitements sur la composition de la communauté virale

#### 3.2.7.1. Analyse des communautés virales initiales

L'analyse de la diversité génomique des concentrats viraux (structure initiale des communautés virales) par PFGE montre la présence de 23 géotypes viraux différents avec en moyenne  $6 \pm 2$  bandes par échantillon. La taille moyenne des génomes viraux est de respectivement 46 et 34 kb au niveau de station A et E. Les tailles de génomes viraux ont été divisées en 8 classes: 21 - 60, 61 - 100, 101 - 140, 141 - 180, 181 - 220, 221 - 260, 261 - 300 et 301 - 340 kb. De février à juillet 2004, les génomes viraux de taille inférieure à 100 kb représentent 97 et 98 % des génomes respectivement à la station A et E. En mars 2004 au point E, il n'a cependant pas été possible d'obtenir une empreinte génomique de la communauté virale.

Selon l'analyse de similarité (CAH avec coefficient de Dice et lien complet), les concentrats viraux présentent une différence saisonnière dans la structure des communautés virioplanctoniques avec une similarité plus grande des concentrats d'été (Figure 3.11).

Les empreintes génomique des communautés virales n'ont pu être obtenues au bout de 90 h de culture en partie à cause de la dilution au 1/10 de l'eau 0.8  $\mu\text{m}$  et de la stabilité des abondances virales durant ce laps de temps.

L'analyse morphométrique des communautés virales initiales montre une nette domination ( $67 \pm 12$  %) de tous les échantillons par des particules ayant une taille de capsid  $< 65$  nm. Une analyse de la fréquence de distribution des tailles de capsides par la méthode du Chi carré montre que la structure du virioplancton est dépendante à la fois du mois de l'expérience mais aussi du point de prélèvement ( $p > 0.05$ ).

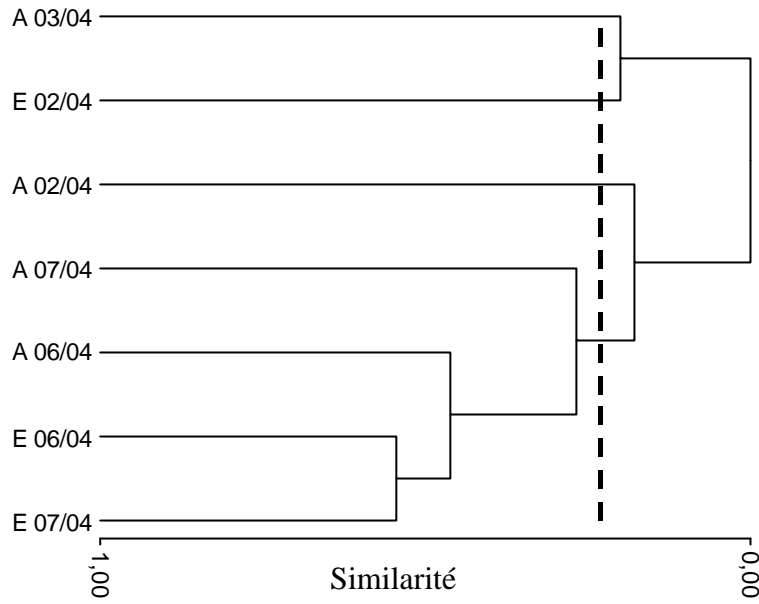


Figure 3.11: Dendrogramme réalisée à partir des données de PFGE obtenues sur les eaux brutes de la station A et E en février, mars, juin et juillet 2004. La ligne en pointillés indique le seuil de significativité à 5 %.

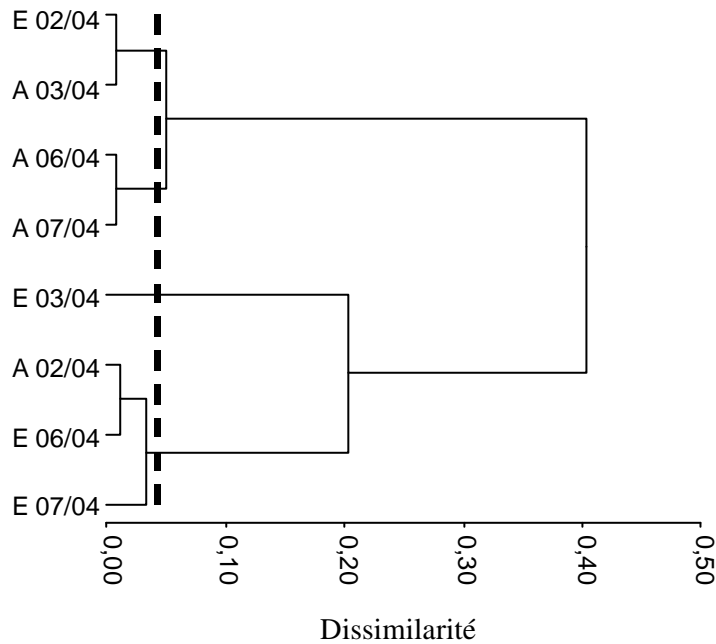


Figure 3.12: Dendrogramme basé sur une classification ascendante hiérarchique (CAH) appliquée aux données morphométriques obtenues sur les eaux brutes. Les deux premiers axes d'une analyse factorielle de correspondance (AFC) appliquée aux donnée morphométriques ont été utilisés pour construire ce dendrogramme. La ligne en pointillés indique le seuil de significativité à 5 %.

Les résultats d'une CAH appliquée aux données morphométriques confirme la formation d'un groupe pour les échantillons E de février et A de mars, qui apparaît significativement distinct selon le critère taille de capsid (Figure 3.12). Toutefois, la saisonnalité dans la structure morphométrique des communautés virales est moins marquée que celle de la structure génomique dans la mesure ou l'échantillon de la station A de février vient se grouper significativement aux échantillons d'été de la station E.

Globalement, les analyses génomiques et morphométriques des communautés virales initiales montrent que pour une expérience donnée, le virioplancton dulçaquicoles et côtiers présentaient des communautés virales différentes excepté en été (spécialement juin) pour lesquelles la génomique indique des communautés virales peu différentes (Figure 3.11).

#### 3.2.7.2. Evolution naturelle des communautés virales et effets de confinement

Excepté en mars où la structure des communautés est restée stable, de profondes modifications sont apparues au niveau de la structure des communautés virales dans l'Erlenmeyer Ec en 90 h (Figure 3.13). En février, la classe de taille 105 - > 125 nm qui n'était pas présente au départ représente 12 % des particules virales après 90 h de culture. En été (juin et juillet), les communautés virales évoluent vers une dominance plus importante de la classe de taille 20 – 64 nm au dépend de la classe de taille 65 – 104 nm.

#### 3.2.7.3. Effet des enrichissements viraux

Après 90 h de culture, tous les Erlenmeyers ayant subit l'addition de concentrat avec des virus actifs ou inactifs présentent des modifications significatives ( $p > 0.05$ , méthode du Chi carré) de la structure des communautés virales par rapport à l'état initial. L'addition de virus autochtones (station E) semble entraîner une amplification de la dominance de la classe de taille 20 – 64 nm au dépend de la classe de taille 65 – 104 nm excepté en février (Figure 3.13). Cet effet n'est pas différent en été de celui du simple confinement. L'addition de virus autochtones inactivés semble aller contre l'effet de confinement en été et favorise le développement de la classe de taille 65 – 104 nm qui devient pratiquement aussi abondante que la classe de taille 20 – 64 nm. La structure des communautés virales dans les traitements  $Ec+V_{Einact}$  reste très proche de la structure des communautés virales initiales.

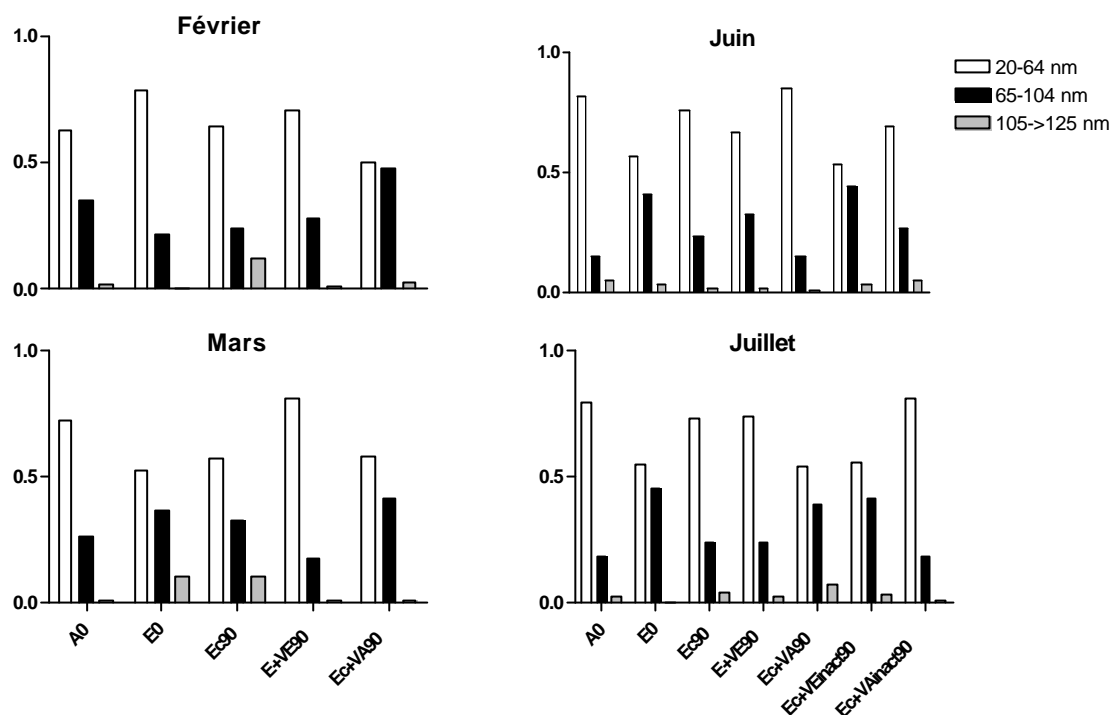


Figure 3.13: Distribution de fréquence des tailles de capsides dans les différents traitements pour chacune des expériences à  $t_{90}$ .

En ce qui concerne les traitements  $Ec+V_A$  et  $Ec+V_{Ainact}$ , les communautés virales initiales correspondent à un mélange de virus côtiers et dulçaquicoles. Les prélèvements pour les analyses des structures initiales ayant été réalisés avant l'addition des concentrats, aucune référence initiale n'est donc disponible pour ces traitements. Toutefois, les communautés virales dulçaquicoles (excepté en février) se caractérisent par de faibles abondances relatives en larges particules virales ( $\geq 65$  nm) comparée aux communautés côtières (Figure 3.13, A0 et E0). L'addition des virus dulçaquicoles n'a donc pas fait augmenter la proportion des larges particules virales. En 90 h, la tendance à favoriser le développement des particules  $\geq 65$  nm dans les traitements  $Ec+VA$  (excepté juin) correspond donc à une évolution des communautés virales.

### 3.3. Discussion

#### 3.3.1. Considérations méthodologiques

Dans cette étude, nous avons réalisé des cultures en batch avec enrichissement viral afin de déterminer l'influence des virus dulçaquicoles sur la structure des communautés bactériennes du bassin de Marennes Oléron. Pour pouvoir parfaitement caractériser les réponses obtenues pour chaque traitement, il était nécessaire de réaliser au moins trois témoins ( $Ec$  : témoin de confinement,  $Ec + V_{Einact}$ , et  $Ec + V_{Ainact}$  : témoins négatifs par inactivation des concentrats viraux). Ainsi, la multiplication des traitements (volumes d'eau à traiter et matériels à utiliser) a rendu impossible la réplication des traitements pour une même expérience. Cependant, ces cultures en batch ont été réalisées deux fois en saison hivernale et deux fois en saison estivale aux températures *in situ* ; en tenant compte du paramètre saison, ces expériences ont pu être comparées afin d'observer la reproductibilité des réponses observées.

Les nutriments minéraux et le carbone organique présents dans les concentrats viraux peuvent stimuler la croissance bactérienne (Proctor et Fuhrman 1992, Noble et al. 1999). Un des principaux biais inhérents à notre protocole concernait le risque d'un enrichissement important en COD dans les traitements recevant les concentrats viraux par rapport au contrôle. Les estimations initiales en COD montrent que les enrichissements potentiellement liés à l'addition des concentrats n'ont eu lieu que de manière limitée. Ce résultat, couplé au fait que la dilution au 1/10 des inocula  $0.8 \mu m$  avec l'ultrafiltrat n'altère pas les

concentrations en COD dans les Erlenmeyers par rapport à l'eau brute, démontre que la majorité des molécules sources de COD ont une taille inférieure à 30 KDa.

Avec un enrichissement viral observé de  $2.1 \pm 0.3$ , les concentrations virales initiales dans les Erlenmeyers reflètent parfaitement l'enrichissement théorique désiré. L'absence de différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les abondances virales initiales dans les traitements contenant les virus intacts et inactivés prouve que l'inactivation des virus par traitement aux micro-ondes n'altère pas l'intégrité physique des virus, telle que décelable en microscopie en épifluorescence. De plus, les abondances virales dans les traitements  $Ec+ V_{Einact}$  et  $Ec + V_{Ainact}$  se maintiennent à un niveau supérieur de ceux affichés dans le contrôle au cours des 90 h d'incubation (notamment en juin, Figure 3.2). Les virus initialement présents dans l'eau 0.8  $\mu m$  ne seraient donc pas les seuls à se développer dans les traitements  $Ec + V_{Einact}$  et  $Ec + V_{Ainact}$ . Ce résultat confirme les observations réalisées dans les expériences à court terme (augmentation de la mortalité bactérienne) et semblent indiquer soit qu'une partie des virus reste actifs après le traitement aux micro-ondes, soit que les concentrats inactivés apportent des macromolécules inductrices de bactéries lysogènes.

La perte bactérienne dans le filtrat 0.8  $\mu m$  due aux différentes étapes de filtration s'élève à  $53 \pm 27$  % en moyenne, ce qui correspond aux valeurs obtenues (47 %) par Massana et al (2001) pour le même type de filtrations. La présence de molécules inhibitrices de la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ne nous a pas permis d'obtenir d'empreintes génétiques des populations bactériennes dans les eaux brutes, excepté en juin au niveau de la station E. La comparaison des profils SSCP de l'eau brute et de l'eau 0.8  $\mu m$ , en juin, montre de profondes modifications (en terme de dominance et de composition) dans la structure des communautés bactériennes. La perte d'espèces bactériennes dominantes, mesurée, en PCR-SSCP n'étant pas homogène au sein de la communauté bactérienne, le fractionnement de l'eau, couramment utilisé dans ce type d'expériences pour éliminer la prédation exercée par les flagellés (Fuhrman et Schwalbach 2003, Schwalbach et Fuhrman 2004, Winter et al. 2004), constitue un biais important qu'il faut prendre en compte lors d'une extrapolation des conclusions d'une étude *in vitro* à l'environnement *in situ*.

La technique de PCR-SSCP permet de séparer, après extraction des ADN totaux et amplification par PCR d'une zone variable de l'ADNr 16S (environ 200 pb), les produits de PCR en fonction de leur polymorphisme de conformation monocaténaire qui dépend de leur séquence (Lee et al. 1996). De fait, une communauté microbienne est représentée par un profil



où chaque pic correspond à une séquence et par extension à une espèce bactérienne, l'aire de chaque pic donnant une indication sur l'abondance de l'espèce dans sa communauté. Cependant, l'utilisation d'une étape d'amplification par PCR entraîne certains biais (Wintzingerode et al. 1997), dont une modification des ratios finaux des amplicons de PCR. Toutefois, deux études utilisant des mélanges de cultures bactériennes pures (Muyzer et al. 1993) et des communautés naturelles (Casamayor et al. 2002) ont démontré que les produits de PCR les plus abondants correspondaient aux populations dominantes des communautés. L'abondance relative de chaque espèce peut donc être utilisée pour suivre leur évolution dans une communauté. La quantité d'ADN utilisée pour chaque PCR constitue un autre biais méthodologique dans la mesure ou il est difficile de standardiser cette quantité même si une attention particulière est apportée à ce problème. En effet plus la quantité d'ADN est grande et plus le nombre de phylotypes détectés est important car les pics les plus petits ont une plus grande chance de dépasser la limite de détection. Afin d'éviter ce biais et de pouvoir comparer la richesse spécifique entre chaque échantillon, seul les pics représentant plus de 0.2 % de l'aire totale (99 % des pics détectés) ont été analysés.

### 3.3.2. Cinétiques microbiennes

#### 3.3.2.1. Croissance bactérienne

**Au cours des quatre expériences réalisées, la température apparaît comme la variable forçante la plus importante conditionnant la dynamique (raccourcissement de la phase latence et augmentation des taux de croissance) des abondances bactériennes** des mois d'hiver vers ceux d'été quelque soit le traitement. Cette saisonnalité reflète celle observée *in situ* pour les abondances microbiennes et la production bactérienne (Tableau 3.2). En février, l'absence d'une phase de croissance exponentielle en 90 h peut s'expliquer par les conditions défavorables (basse température et faible production bactérienne) rencontrées *in situ*. Si la température joue un rôle primordial dans le contrôle des taux de croissance et le temps de latence, elle ne modifie pas significativement ( $p > 0.05$ ) la biomasse bactérienne finale produite.

Les forts ratios DIN : PO<sub>4</sub> observés au début de chaque expérience pouvaient faire craindre des conditions limitantes en PO<sub>4</sub> au cours du temps ; cependant les phosphates n'ont pas atteint un niveau limitant pour la croissance bactérienne. Toutefois, les décroissances des concentrations observées ponctuellement pour le PO<sub>4</sub> et le COD ainsi que les corrélations

entre les abondances bactériennes et les concentrations en  $\text{PO}_4$  et COD témoigne de l'utilisation de ces derniers par les bactéries.

Dans tous les cytogrammes obtenus, les cellules bactériennes se discriminent nettement en deux sous populations facilement délimitées dans une fenêtre selon les paramètres SSC et fluorescence verte (SYBR green I). Les bactéries HNA constituent les cellules les plus actives et contribuent à la plus grande partie de l'activité des communautés bactériennes d'échantillons d'eau douce, marine et saumâtre (Gasol et al. 2002, Lebaron et al. 2002). Le %HNA peut être considéré comme un indice des cellules actives qui regroupent indifféremment des cellules qui se multiplient et qui contiennent ainsi beaucoup d'ARN, des cellules avec plasmides, des cellules avec plusieurs copie de génomes sans oublier les cellules infectées. Ces cellules HNA sont toujours distribuées sur une échelle SSC large, traduisant une grande variabilité dans les biovolumes bactériens et par conséquent une grande hétérogénéité de leur activité spécifique (Lebaron et al. 2000). Or la proportion initiale de ces cellules augmente de février à juillet (Figure 3.2). Le raccourcissement de la phase de latence et l'augmentation des taux de croissance bactériens des expériences d'hiver vers celles d'été seraient donc également liés à l'augmentation du nombre de bactéries actives à l'état initial.

L'entrée des bactéries en phase exponentielle s'accompagne de nombreux changements dans les paramètres microbiens comme en témoignent l'évolution de ces paramètres (Figure 3.6). L'augmentation de l'activité bactérienne et du nombre croissant de bactéries se divisant pendant cette phase sont illustrés par les corrélations des abondances bactériennes avec la production et les biovolumes (Tableau 3.3). Une activité ainsi que des biovolumes plus importants qu'à l'état initial caractérisent les communautés bactériennes au terme des 90 h d'expériences (excepté en février). **Ces changements semblent indiquer qu'au cours de nos expériences, une sélection ou une modification physiologique et morphologique des populations s'effectuent au niveau de la communauté bactérienne.** La forte corrélation entre les abondances bactériennes totales et le %HNA indique que la dynamique des abondances bactériennes correspond à celle de la sous population HNA (Tableau 3.3).

L'expérience préliminaire réalisée en novembre 2003 ainsi que les taux de mortalité bactérienne d'origine virale mesurés par les expériences d'ajouts dosés laissent supposer un effet plus important des enrichissements viraux sur les abondances bactériennes que celui obtenu dans les expériences à long terme. Une réduction des effets de confinement

consécutives à l'utilisation de volumes beaucoup plus importants (4 l au lieu de 250 ml dans les expériences à court terme) peut constituer un élément de réponse. **Cependant, les résultats obtenus dans les expériences à long terme corroborent parfaitement ceux obtenus dans les expériences d'ajouts dosés puisque la mortalité bactérienne apparente en 6 h est plus élevée dans les traitements recevant les concentrats actifs que dans le contrôle.** La mortalité bactérienne apparente inférieure trouvée dans les traitements recevant les concentrats inactivés prouve que ce sont bien les virus qui engendrent cette mortalité bactérienne. La valeur de mortalité bactérienne apparente d'origine virale retrouvée dans ces expériences ne correspond qu'à une différence de biomasse entre deux traitements et ne peut et ne doit pas être comparée aux **taux de mortalité bactérienne** trouvés dans les expériences à court terme qui eux représentent un processus (modification du taux de croissance bactérien).

**L'absence de différence entre l'action des concentrats viraux dulçaquicoles et côtiers corrobore également les résultats trouvés dans les expériences d'ajouts dosés et démontre que le maintien des virus dulçaquicoles s'effectue au moyen d'infections lytiques.**

Dans des conditions différentes (présence de flagellés et mortalité bactérienne mesurée en 24 h), Proctor et Furhman (1992) ont également obtenu une réduction de 25 % des abondances bactériennes dans leur traitement enrichi en virus par rapport à leur contrôle. En revanche, d'autres travaux ont montré au contraire une stimulation de la croissance bactérienne suite à un enrichissement viral et ont attribué cette stimulation aux produits de la lyse virale (Lammers 1992, Peduzzi et Weinbauer 1993, Weinbauer et Peduzzi 1995a, Noble et al. 1999, Winter et al. 2004). Weinbauer et Peduzzi (1995a) ont de plus montré que cette libération de MOD (matière organique dissoute) par lyse virale s'effectuait dans les premières heures (5.5 h) suivant l'addition du concentrat viral ce qui est en relation avec la mortalité en 6 h observée dans nos travaux. **La stimulation de la croissance bactérienne, en revanche, n'a été visible que dans les traitements  $E_c + V_{E\text{inact}}$  et  $E_c + V_{A\text{inact}}$  (Figure 3.5).** Celle-ci serait plutôt la conséquence directe de l'apport de MOD contenues dans les concentrats (Proctor et Fuhrman 1992, Noble et Fuhrman 1999, Noble et al. 1999).

**Si l'effet des enrichissements est incontestable dans les premiers stades de la croissance bactérienne, leur influence à long terme (90 h) sur les taux de croissance et la biomasse bactérienne nette produite est moins marquée.** Les infections lytiques (par les

différents produits de lyses cellulaires) ainsi que l'apport de MOD par les concentrats sont certainement à l'origine de la stimulation des taux de croissance et de la production nette dans les traitements  $Ec + V_E$  et  $Ec + V_A$  en mars (Figure 3.3A et Figure 3.6). Chaque système hôte – virus ayant sa propre spécificité (lytique ou lysogène, durée de la phase de latence, burst size important ou non), la mortalité bactérienne liée au virus dépend de la nature des systèmes hôtes phages présents et de la quantité de bactéries résistantes (Middelboe 2000, Wommack et Colwell 2000, Weinbauer 2004). La différence saisonnière retrouvée dans la composition de communautés bactériennes des stations A et E (Figure 3.1) pourrait donc être un des facteurs expliquant **la disparité dans l'effet des concentrats viraux**. Les résultats obtenus lors des expériences à court terme laissent soupçonner la présence d'une plus grande quantité de bactéries résistantes en été. Ceci expliquerait le manque d'effet des enrichissements viraux sur les paramètres de la croissance bactérienne lors des mêmes mois dans les expériences à long terme.

La plus grande quantité de biomasse bactérienne nette ayant été produite dans les traitements contenant les concentrats inactivés (Figure 3.3B) et la biomasse produite étant 5 fois plus forte dans ces mêmes traitements en juin (Figure 3.2), cela confirme l'apport de macromolécules (MOD) lors de l'addition des concentrats.

#### 3.3.2.2. Cinétique de production virale

**Les fluctuations observées au niveau des abondances virales dans tous les traitements sont la résultante des processus de production et de mortalité virale prouvant l'existence de communautés virales actives dans tous les traitements** (Figure 3.2). Le calcul du ratio biomasse finale / biomasse initiale montre que les processus de production sont légèrement supérieurs aux processus de perte (excepté en février dans les traitements  $Ec + V_E$  et  $Ec + V_A$ ) ce qui permet le maintien des communautés virales (Figure 3.3C). **Ce maintien n'est possible qu'en présence de processus d'infection lytique** (Noble et Fuhrman 2000). De plus, les abondances virales mesurées au cours de nos expériences (quelque soit le traitement) ne sont jamais descendues en deçà de 4 % de la concentration *in situ* ce qui démontre que **les processus de lysogénie ne constituent pas une source importante de production virale** (Wilcox et Fuhrman 1994). Les bactéries étant les seuls hôtes potentiels pour les virus dans nos expériences, la dynamique des abondances virales repose donc essentiellement sur celle des communautés bactériennes, ce qui confirme les corrélations entre les abondances virales et bactériennes. L'absence de corrélation en février,

mois où l'activité des bactéries a été la plus faible, démontre la dépendance de la production virale vis à vis d'une communauté bactérienne active (Wommack et Colwell 2000). La corrélation pour les mois de mars et juin, entre les abondances virales et la production bactérienne ainsi qu'avec le %HNA tend à confirmer cette relation étroite entre la production virale et l'activité de leurs cellules hôtes. Enfin, et c'est sûrement la preuve la plus évidente de cette relation,  $72 \pm 20$  % de la biomasse virale (excepté pour le traitement  $Ec + V_{Ainact}$ ) est produite au moment où l'activité des bactéries est la plus intense : la phase exponentielle de croissance (Figure 3.4).

Le fait qu'une plus faible proportion de la biomasse virale soit produite pendant la phase exponentielle de croissance bactérienne dans les traitements ayant reçu les concentrats inactivés semble démontrer que l'inactivation des concentrats a fonctionné même s'il est possible qu'une partie des virus restent actifs. Pour chaque traitement, le taux de production viral (Figure 3.4) correspond à la moyenne de toutes les phases de production virales se déroulant au cours des 90 h. Ces taux de production atteignent des valeurs maximales pendant les phases de croissance exponentielle bactérienne (Figure 3.2). Dans la mesure où au moins 50 % de cette production virale ne s'effectue pas dans la phase exponentielle de croissance pour les traitements  $Ec + V_{Einact}$  et  $Ec + V_{Ainact}$ , cela explique les plus faibles taux de production viraux dans ces traitements. Il convient tout de même de justifier cette différence : les particules virales inactivées n'étant pas altérées dans leur intégrité physique, leur action pourrait être comparée à celle des bactériocines. Celles-ci sont connues pour avoir une activité bactéricide (Duckworth 1970). De plus en occupant les récepteurs viraux à la surface des bactéries, ces particules inactives empêcheraient la fixation de particules intactes et entraîneraient la diminution des taux de production viraux.

Les taux de production viraux sont significativement plus élevés dans le contrôle et les traitements  $Ec + V_E$  et  $Ec + V_A$  que dans les traitements  $Ec + V_{Einact}$  et  $Ec + V_{Ainact}$  (Figure 3.4). Or ce n'est pas le cas de la biomasse virale produite (Figure 3.3C). Ce qui suggère un taux de mortalité viral plus important dans le contrôle et les traitements  $Ec + V_E$  et  $Ec + V_A$  qui pourrait être dû à un relargage plus important de matière organique virucide consécutif à un plus grand nombre d'infections lytiques (Winter et al. 2004). L'importante biomasse virale nette produite dans le contrôle en juillet ne peut s'expliquer que par une diminution de la mortalité virale mais l'origine de cette diminution n'est pas connue.

Enfin, le maintien des abondances virales dans le traitement Ec + V<sub>A</sub> à des niveaux supérieurs à celui du contrôle signifie que **les virus dulçaquicoles sont soit capables de trouver leurs cellules hôtes ou soit capables de s'adapter aux cellules présentes (large spectre d'hôtes, Jensen et al. 1998, Waterbury et al. 1993) dans la communauté bactérienne côtière.** Ce résultat confirme les résultats obtenus dans le premier chapitre et sont en accord avec les récents travaux de Sano et al (2004). L'analyse de la composition des communautés bactériennes des eaux de la station A et E par PCR-SSCP tend à privilégier la première hypothèse puisque 50 % des espèces détectées à la station A se retrouvent à la station E. Ceci corrobore les récents résultats publiés par Short et Suttle (2005) suggérant la présence d'hôtes ubiquistes et de leur virus dans les systèmes dulçaquicoles et marins.

### 3.3.3. Evolution de la composition des communautés bactériennes et virales

#### 3.3.3.1. Effet du confinement

Toutes les études ayant suivi la composition des communautés bactériennes lors d'expériences *in vitro* mettent en évidence un impact très important (souvent le plus fort) du confinement sur ces communautés (Massana et al. 2001, Schwalbach et Fuhrman 2004, Winter et al. 2004). Dans toutes nos expériences, la composition initiales des communautés bactériennes (E 0.8 µm) se distingue de celles observées dans les autres traitements (dendrogrammes sur Figures 3.9 et 3.10) confirmant **l'impact important du confinement sur les communautés bactériennes. Dans tous les traitements ainsi que les contrôles, cette modification des communautés bactériennes se traduit par une diminution de la richesse spécifique** déjà mise en évidence par Winter et al. (2004) et **un accroissement de la dominance** (Tableaux sur Figures 3.9 et 3.10). En plus de l'effet confinement, l'élimination des flagellés et du phytoplankton (i.e. suppression des pressions de prédation et de la compétition vis à vis des ressources minérales) ont certainement contribué aux modifications observées dans les communautés bactériennes.

Les profils SSCP montrent qu'au cours de chaque croissance bactérienne l'équilibre qui existait à l'état initial entre deux groupes (groupes A et B) d'espèces bactériennes a été rompu au profit du groupe B. La diminution de la richesse spécifique est essentiellement due à la disparition d'espèces bactériennes provenant du groupe A (Figures 3.9 et 3.10), alors que le développement très important d'espèces faisant partie du groupe B est la cause de

l'augmentation de la dominance. L'effet de confinement semble diminuer avec le nombre de générations car 65 % de la richesse spécifique est perdue en février contre une moyenne de 22.5 % pour les mois d'été. Ce sont les espèces du groupe A qui sont responsables de ce phénomène puisqu'elles (1) restent présentes ou (2) réapparaissent en 90 h en été alors qu'elles disparaissent pratiquement totalement en hiver. Dans le cas (2), une hyper sensibilité aux stress provoquée par les différentes étapes du protocole et une adaptation lente aux nouvelles conditions de culture pourraient la dynamique de ce groupe d'espèces. La perte de compétitivité des espèces du groupe A permettrait donc le développement des espèces plus opportunistes du groupe B. Si les espèces du groupe B étaient soumises à une forte pression de grazing dans le milieu naturel, l'élimination des flagellés pourrait fournir une explication supplémentaire à leur développement.

Il est intéressant de constater que l'évolution de la population HNA (minoritaire à  $t_0$  et majoritaire à  $t_{90}$ ) est parallèle au développement des abondances relatives des phylotypes du groupe B. La nature exacte des sous populations HNA et LNA est actuellement peu connue et a fait l'objet de travaux dont les conclusions sont antagonistes. Le but de ces travaux était de déterminer si chacune de ces sous populations est représentée par des phylotypes distinct (Zubkov et al. 2001) ou si ces sous populations représentent deux états physiologiques d'un même phylotype (Servais et al. 2003). A l'état initial, les bactéries du groupe A représentent 66 % de l'abondance bactérienne relative et au même moment la sous population LNA représentent 71 % des abondances bactériennes. En considérant que la sous population LNA est représentée par des phylotypes propres, une majorité de cette sous population serait donc constituée par les espèces du groupe A. Ce groupe périssant complètement au cours de nos expériences, une réduction de l'abondance des cellules LNA serait donc logique or, malgré une proportion diminuant nettement, l'abondance des cellules LNA augmente au cours des 90 h (données non montrée). Nos résultats semblent donc confirmer l'hypothèse proposée par Servais et al. (2003).

La modification des communautés virales est en accord avec l'importante modification retrouvée dans la composition des communautés bactériennes : en été, comme pour les communautés bactériennes, l'effet du confinement se traduit par le développement d'une classe de taille (20 – 64 nm). En revanche, il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet commun à tous les traitements ce qui aurait du être le cas puisque tous les Erlenmeyers sont soumis à l'effet de confinement. Ceci est très certainement du au faible niveau de diversité atteint par mesure des tailles de capsides.



3.3.3.2. Effets des traitements sur la composition des communautés bactériennes et virales

Si l'effet de confinement est incontestablement la force ayant entraînée le plus de modification dans les communautés bactériennes, l'addition des différents concentrats a eu également un impact non négligeable comme le montrent les différences dans la composition des communautés (Dendrogrammes sur figures 3.9 et 3.10).

**Les produits de la lyse virale et la MOD contenue dans les concentrats pouvant stimuler la croissance des cellules non infectées (Middelboe et al. 2001) et la compétition interspécifique diminuant sous l'effet des lyses virales, les abondances de certaines populations bactériennes devraient être stimulées par l'addition des concentrats viraux. C'est effectivement l'effet le plus important des enrichissements viraux sur les communautés bactériennes.** Chaque type de concentrats (virus dulçaquicoles ou côtiers), qu'il ait été inactivé ou non, entraîne des modifications spécifiques dans les communautés qui lui sont propres (dendrogramme juillet dans Figure 3.9). Cette spécificité des communautés obtenue dans chaque type de traitement traduit la spécificité de l'infection virale (i.e. les virus dulçaquicoles et côtiers n'infectant pas les mêmes espèces, ce ne sont pas les mêmes phylotypes dominants qui se développent en 90 h). L'absence de différence dans l'effet de chaque concentrat actif et son homologue inactif sur la structure des communautés bactériennes confirme que les virus ne sont pas complètement inactivés par les miro-ondes. Il est très peu probable qu'une substance bioactive contenue dans les concentrats puisse entraîner une telle spécificité dans la composition des communautés.

La stimulation des populations bactériennes par l'addition des concentrats est notamment visible en février et juillet où l'abondance relative de nombreuses populations du groupe B augmente nettement dans les traitements  $E_c + V_E$  et  $E_c + V_A$  par rapport au contrôle (profils SSCP dans Figures 3.9 et 3.10). En plus de cet effet, les enrichissements viraux provoquent, parmi les phylotypes dominants, la réapparition des phylotypes ayant disparus dans le contrôle avec l'effet de confinement ou l'apparition de nouveaux phylotypes. La conséquence directe de ce développement bactérien est une augmentation de la richesse spécifique notamment pour le traitement  $E_c + V_E$  en février et juillet (tableaux dans Figure 3.9 et 3.10) avec conjointement une dominance plus importante en février. **Globalement, les enrichissements viraux entraînent donc une augmentation de la richesse spécifique et / ou une augmentation de la dominance.** En infectant spécifiquement



les membres les plus abondants (dominants) des communautés bactériennes, les virus permettraient d'éviter l'exclusion de populations moins compétitives et donc un maintien de la richesse spécifique et de l'homogénéité (inverse de la dominance) à l'intérieur de ces mêmes communautés (Thingstad et Lignell 1997, Wommack et Colwell 2000). Si nos résultats concernant la richesse spécifique vont dans le sens de cette théorie puisque **les effets des enrichissements viraux s'opposent à la réduction du nombre de phylotypes due au confinement**, les résultats concernant la dominance vont dans le sens inverse. Une des raisons pouvant expliquer ce décalage pourrait venir des phénomènes de résistance bactérienne. Waterbury et al. (1993) et Lenski (1988) ont démontré qu'en culture pure ou en chémostat, la majorité des bactéries étaient résistantes aux infections virales. Lors d'un bloom phytoplanctonique, Maranger et al. (1994) ont observé une diminution brutale du VBR parallèle à l'augmentation des abondances bactériennes et ont suggéré l'existence d'une sélection des formes bactériennes résistantes exercée par les infections virales. **L'importante réduction du VBR observée dans nos expériences concorderait donc avec l'acquisition par les bactéries d'une résistance aux infections virales.**

Si une majorité des phylotypes sont résistants, quels sont ceux qui supportent la production virale ? Une partie de cette production virale doit s'effectuer au niveau des phylotypes réprimés lors de l'addition des concentrats viraux. Mais la majorité de la production virale s'effectuant au niveau de la croissance exponentielle, ce sont donc les phylotypes se développant le plus lors des 90 h d'expérience qui sont responsables de cette production. Il y a donc antagonisme avec les conclusions tirées du paragraphe précédent sauf si comme le suggère Schwalbach et al. (2004), **chaque phylotype existe simultanément sous une forme sensible et résistante aux virus.** Middelboe (2000) a démontré que les virus pouvaient modifier les ratios entre les clones résistants et sensibles d'une même population bactérienne. Même si de tels changements ne sont pas détectables par une méthode basée sur la différence de séquence des ADNr 16S, cela suppose que, **pour une même communauté bactérienne, l'action de deux communautés virales différentes engendrerait deux compositions clonales différentes. Par extension, les populations dominantes (résistantes) dans ces communautés ne seraient pas les mêmes puisque la proportion de clones sensibles et résistants pour un même phylotype serait différente.** L'acquisition d'une résistance aurait un coût physiologique permettant le maintien des clones sensibles (i.e. conservation d'un avantage de croissance vis à vis des clones résistants) (Chao et al. 1977). Cette hypothèse concorderait avec les différentes communautés obtenues pour chaque type de

concentrat. De plus cela pourrait expliquer pourquoi en juin, des communautés virales très proches engendreraient des communautés bactériennes très proches également (dendrogramme juin dans Figure 3.10). Cette situation pourrait constituer un atout important dans la survie des bactéries en milieu carencé en nutriments car elles pourraient sacrifier une partie de leur population en les rendant sensible aux attaques virales afin de permettre la survie des formes résistantes.

La disparité observée dans l'effet des enrichissements sur la composition des communautés bactériennes provient très certainement, comme c'était le cas pour les abondances bactériennes, de la différence dans les systèmes hôte – phages ainsi que des différents paramètres d'incubation entre les expériences (i.e. température). Cette disparité est également visible au niveau de la réponse des communautés virales aux différents traitements. Pour un traitement donné, il semble difficile de relier les modifications observées dans les communautés bactériennes à celles observées dans les communautés virales dans la mesure où les méthodes utilisées pour déterminer la structure de ces communautés n'accèdent pas au même niveau de diversité. Toutefois, les modifications observées dans les communautés virales parallèles à celles observées dans les communautés bactériennes démontrent la relation étroite entre la diversité bactérienne et virale. De plus, la différence de structures obtenues entre les deux types de concentrats reflète d'une manière plus marquée, celle obtenue entre les communautés bactériennes.

Dans cette étude, les enrichissements viraux n'ont pas modifié la dynamique générale des abondances bactériennes en 90 h par rapport à la température et certainement la compétition interspécifique parmi les phylotypes résistants (Middelboe et al. 2001). Cependant les conséquences des infections virales observées dès les premières heures des cultures semblent être la source de compositions clonales bactériennes différentes selon le type de concentrat (dulçaquicole ou côtier), et par extension de compositions spécifiques différentes parmi les phylotypes dominants des communautés bactériennes. En outre, nos résultats montrent que les virus dulçaquicoles sont non seulement capables de retrouver et d'infecter leurs cellules hôtes mais également de modifier la composition des communautés bactériennes côtières au même titre que les virus autochtones. Ces résultats sont en accord avec la théorie du «killing the winner » qui suggère un contrôle de la composition des communautés bactérienne par les virus. Toutefois, l'augmentation de la dominance observée dans les traitements contenant les concentrats viraux est en désaccord avec cette théorie.

De la même manière que dans le chapitre 2 de cette partie, les résultats obtenus proviennent d'expériences très simples par rapport à la complexité du milieu naturel. Il serait donc très présomptueux d'affirmer que les virus dulçaquicoles sont capables de modifier la composition des communautés bactériennes côtières. Toutefois, si c'était le cas, les modifications dans la composition se traduiraient par des modifications des propriétés de la communauté (degré d'activité, croissance...) dans la mesure où chaque espèce possède ses propres propriétés.

## 4. Synthèse

Les résultats trouvés dans les expériences à court et long terme concordent sur de nombreux points et montrent globalement que :

**En l'absence de pertes virales (grazing par les flagellés, UV et adsorption sur les particules), les virus autochtones (station E) sont capables de lyser 79 % de la production bactérienne dans les 6 premières heures des incubations. Aucune variation saisonnière du taux de mortalité bactérienne d'origine virale n'a pu être détectée.**

**Les virus dulçaquicoles sont capables de lyser 71 % de la production bactérienne à l'intérieur des communautés bactériennes côtières.** Cela démontre que non seulement, **les virus conservent leur infectiosité durant le transfert le long de l'estuaire, mais aussi qu'ils sont capables de retrouver leurs cellules hôtes au niveau du bassin** dans la mesure où la moitié des phylotypes bactériens détectés au niveau de la rivière sont présents au niveau du bassin. L'existence d'un large spectre d'hôtes viral n'est toutefois pas exclue.

**Les abondances bactériennes peuvent être sévèrement affectées par les virus dès les premières heures suivant l'addition des concentrats viraux.** La mortalité bactérienne inférieure retrouvée dans les concentrats inactivés prouve **que ce sont les virus, qui par infection lytique, sont responsables de ces pertes bactériennes.**

**L'inactivation des concentrats viraux par les micro-ondes ou les UV n'est jamais complète puisque ceux-ci conservent la possibilité d'engendrer une mortalité résiduelle** dans les premières heures suivant leur addition ainsi que de modifier la composition des communautés bactériennes en 90 h.

**La température ainsi que les relations interspécifiques (i.e. compétition pour la ressource) constituent les variables forçantes principales contrôlant les cinétiques de croissance bactériennes dans nos expériences.** De plus ce serait plutôt la dynamique des abondances bactérienne et l'activité des bactéries qui contrôleraient la dynamique et la production des virus dans la mesure où **72 % de la biomasse virale est produite pendant la croissance exponentielle des bactéries.**

**En enrichissant le milieu en produit de lyse et nutriment, les virus permettent de diminuer la pression de compétition pour les ressources et ainsi favoriser, comme l'implique la théorie du « killing the winner », une richesse spécifique plus importante. En revanche, les virus entraînent également une dominance plus importante des communautés bactériennes par quelques phylotypes résistants aux infections virales.**

**La diminution du VBR parallèle à l'augmentation des abondances bactériennes indique l'acquisition rapide par les bactéries d'une résistance aux infections virales. De plus, la proportion de bactéries résistantes semble influencer par la température. Toutefois, la majorité de la production virale s'effectuant par les phylotypes les plus dynamiques et actifs, cela suggère la présence de clones sensibles et résistants à l'intérieur de chaque phylotype.**

**Les infections virales observées dans les premières heures des cultures semblent être la source de modifications au niveau de la composition clonale des communautés bactériennes. En agissant sur cette composition clonale, les virus modifieraient la composition des phylotypes dominants.**

**En infectant différents phylotypes et / ou en modifiant la composition clonale de manière différente que les virus autochtones, les virus dulçaquicoles entraînent l'apparition en 90 h de communautés bactériennes différentes de celles soumises à l'action des virus autochtones.**

## Conclusion générale et perspectives

L'influence des apports fluviaux en terme d'apports nutritifs (MOD, azote total, COD...) au niveau des zones côtières n'est plus à démontrer. Par ces apports, les fleuves contribuent significativement à la productivité et à l'eutrophisation des zones côtières (Seitzinger et Sanders 1997). Parmi les éléments constituant cette MOD fluviale se trouve une très grande quantité de particules virales ( $10^6 - 10^8$  PAV  $\text{ml}^{-1}$ , Wommack et Colwell 2000). Depuis les 15 dernières années, malgré une intensification des recherches sur le rôle écologique des virus dans les écosystèmes aquatiques et plus précisément sur les réseaux microbiens, beaucoup de questions restent en suspens et certaines idées préconçues sont actuellement remises en causes (spécificité du spectre d'hôtes, théorie du « killing the winner »). Parmi toutes les recherches effectuées en écologie virale, aucune ne s'est intéressée à l'influence des virus dulçaquicoles transportés par les fleuves sur les dynamiques planctoniques des eaux côtières et c'est en cela que cette étude est originale. Les bactéries constituant les principaux hôtes des virus dans les écosystèmes aquatiques et étant les principaux remobilisateurs de la MOD, cette étude s'est focalisée sur les interactions virus – bactéries. Les deux approches complémentaires, *in situ* et *in vitro*, ont permis d'apporter chacune des éléments de réponse permettant de penser que les virus dulçaquicoles pourraient jouer un rôle dans la productivité du bactérioplancton côtier en modifiant sa composition.

La nécessité de pallier à l'absence totale de données sur les variables microbiologiques de la Charente, ainsi que de déterminer un cadre temporel aux expériences *in vitro* font que l'approche *in situ* a été la première utilisée. Cette approche nous a conforté très rapidement à la fois dans notre questionnement puisque les abondances virales dulçaquicoles ont toujours surpassé celles côtières, et dans le choix de notre modèle hôte – virus puisque les bactéries se sont avérées les principaux hôtes des virus dans l'estuaire de la Charente et le bassin de Marennes Oléron. De plus la forte similarité retrouvée dans la structure des communautés virales dulçaquicoles et côtières semblait témoigner d'un transfert de particules virales de la rivière vers le bassin.

L'importante variabilité saisonnière affichée par les dynamiques virales souligne le contrôle majeur exercé par la température sur les abondances virales via le contrôle des

abondances bactériennes. Étonnamment, l'importante différence de salinité entre la rivière et le bassin (0.2 – 32.5 PSU) joue un rôle moins important que l'hydrodynamisme (débit et phénomènes de dilution) dans le contrôle de la dynamique spatiale des abondances virales. Toutefois, les légères différences observées dans la structure des communautés virales entre la rivière et le bassin traduisent l'existence de systèmes hôtes –virus spécifiques aux deux stations.

En apportant les preuves d'un transfert de particules virales de la rivière vers le bassin, ce suivi a justifié l'intérêt des hypothèses testées : conservation de l'infectiosité des particules virales dulçaquicoles et de leur impact sur les communautés bactériennes côtières. La réponse à de telles questions ne peut être apportée par une étude *in situ* tant les interactions entre les acteurs des réseaux trophiques microbiens sont complexes. Les interactions virus – bactéries ont donc été étudiées par l'intermédiaire d'expérience *in vitro* dans lesquelles les communautés bactériennes du bassin ont été soumises à l'action de concentrats viraux.

L'un des avantages des expériences *in vitro* est de permettre une observation plus fine de certains processus mis en évidence *in situ*. La relation entre les abondances virales et bactériennes en est un très bon exemple. Alors que le suivi nous permettait uniquement de supposer que les bactéries constituaient les principaux hôtes des virus, les expériences *in vitro* vont plus loin en montrant que la production virale et donc la dynamique des abondances virales est étroitement liée à l'activité des bactéries.

Les résultats obtenus au cours de ces expériences montrent que malgré une production virale s'effectuant majoritairement par infections lytiques, les virus ont un moindre effet sur la dynamique des abondances bactériennes que la température. Cette situation tiendrait à l'acquisition rapide par les bactéries, de mécanismes de résistance vis à vis des virus. Cependant, nos résultats montrent également que les virus sont capables de modifier la composition des communautés bactériennes et de s'opposer à l'effet de confinement pour maintenir la richesse spécifique, deux notions clef de la théorie du « killing the winner ». Cette théorie prévoit également le bloom de quelques populations bactériennes et leur déclin sous l'action des virus, cependant les résultats montrent au contraire que les blooms persistent et donc que la dominance est favorisée par l'addition de virus.

La capacité des virus dulçaquicoles (1) à infecter les cellules de la communauté bactérienne côtière, (2) à entraîner la destruction de 71 % de la production bactérienne en 6 h

et (3) de modifier la composition des communautés bactériennes en 90 h constituent les résultats les plus intéressants et les plus intrigants à la fois. Intrigant car les virus dulçaquicoles ont entraîné la même mortalité et se sont développés de la même manière que les virus autochtones (i.e. du bassin). Bien que les virus puissent posséder un large spectre d'hôtes (Suttle et Chan 1993, Waterbury et Valois 1993, Wichels et al. 1998), la présence de 50 % des phylotypes bactériens dominants dulçaquicoles au niveau des eaux du bassin suggère également que les virus dulçaquicoles sont capables de retrouver et d'infecter leurs cellules hôtes. Un simple processus de dilution ne peut expliquer la présence d'une aussi grande quantité de phylotypes bactériens communs aux deux systèmes. Ce sont donc très certainement des phylotypes amphihalins capables de se développer à la fois au niveau de la rivière et du bassin. Ce résultat confirme la similitude des structures virales observées le long de l'estuaire de la Charente pendant le suivi, même si l'approche par PFGE, qui présente une plus faible résolution que la PCR-SSCP, donne une homogénéité plus grande dans la structure des populations virales.

Conclure que les apports fluviaux en virus au niveau du bassin de Marennes Oléron modifient la productivité des communautés bactériennes côtières seraient largement abusif. Cependant, les résultats apportés par ces travaux de thèse laissent entrevoir qu'à l'échelle d'un fleuve et de ses variations de débits, un apport massif et ponctuel de virus dulçaquicoles pourrait, en modulant la composition des communautés bactérienne, jouer un rôle dans la productivité de ces mêmes communautés. En revanche, prévoir quels effets ont les virus dulçaquicoles sur les communautés bactériennes côtières semble complètement illusoire tant les processus intervenants dans les interactions virus – hôtes sont nombreux et notre méconnaissance de ceux-ci importante. Les phénomènes de résistance en sont un exemple parfait : quels sont les facteurs déclenchant ces phénomènes ? Quels sont les phylotypes résistants dans une communauté ? Sont-ce des phylotypes à part entière ou existe-t-il des clones résistants et des clones sensibles comme le suggère cette étude ?

En ayant mesuré certains processus comme les taux de mortalité bactérienne d'origine virale par les expériences *in vitro*, et en disposant de quelques paramètres comme les débits et la dynamique spatio-temporelle des abondances virus, mesurés *in situ*, il devient très intéressant d'évaluer la quantité de carbone libérée au niveau du bassin sous l'action des virus dulçaquicoles. Cependant certains paramètres comme la proportion des virus dulçaquicoles arrivant au niveau du bassin en été ne sont pas disponibles. En hiver, les abondances virales suivant un modèle de dilution, il devient possible d'estimer cette proportion. En utilisant les



paramètres répertoriés dans le tableau X, au cours de la saison hivernale, les virus dulçaquicoles transportés par la Charente entraîneraient la libération de 2.6 tonnes de carbone vers le pool de MOD au niveau du bassin, ce qui représente 0.2 % de la production primaire. La quantité de carbone transférée vers le pool de MOD par les virus autochtones représente l'équivalent de 2 % à 6 % de la production primaire de carbone respectivement en hiver et en été. Ces valeurs correspondent aux estimations réalisées par Wilhelm et Suttle (1999) qui évaluaient de 3 à 15 % la proportion du carbone organique bactérien initialement fixé par photosynthèse retournant au pool de MOD lors des lyses virales. Ces calculs, bien que simplistes, montrent l'impact non négligeable des virus dans le cycle du carbone et la nécessité de les prendre en compte dans les futurs modèles de flux trophiques.

Tableau 4.1: Variables utilisées pour l'estimation de la quantité de carbone libérées lors des lyses virales.  $P_{\text{bact}}$  correspond aux moyennes saisonnières de la production bactérienne observées lors du suivi.  $P_L$  représente la proportion de la production bactérienne lysée par les virus dulçaquicoles ( $V_A$ ) et les virus côtiers ( $V_E$ ). Chl  $a$  et PP représentent respectivement les valeurs moyenne saisonnière des concentrations en chlorophylle  $a$  et de la production primaire. Les valeurs de Chl  $a$  proviennent du suivi et les valeurs de PP mesurées au niveau de l'estuaire externe de la Charente proviennent de la thèse de Ravail-Legrand (1993).

$P_{\text{bact}}$ ( $\mu\text{gC l}^{-1} \text{j}^{-1}$ )		$P_L$ (%)		Chl $a$ ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		PP ( $\text{mgC mgChl a}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	
Eté	Hiver	VA	VE	Eté	Hiver	Eté	Hiver
37.3	5.7	71	79	4.8	1.07	4.39	9.35

La quantité et la qualité de la MOD libérée par les lyses virales n'a pas été mesurée dans nos expériences *in vitro*. Pourtant la MOD libérée par lyse virale semble d'autant plus intéressante à mesurer qu'elle semble avoir une importance cruciale dans le maintien de la richesse spécifique et de la stimulation de certains phylotypes lors ces lyses.

Le suivi de la diversité virale génomique par PFGE montre les limites de cette technique, qui n'offre finalement qu'une image à faible résolution des communautés virales. Malheureusement, actuellement, c'est la seule technique permettant d'obtenir l'empreinte d'une communauté virale dans son ensemble. Il convient donc d'essayer de l'améliorer. Une des voies possibles serait la réalisation de deux gels permettant de faire migrer deux classes de génomes viraux (400 – 50 kb et 50 – 10 kb) afin d'obtenir une meilleure résolution. Afin qu'un nombre significatif de populations virales puissent dépasser le seuil de détection de

cette méthode, la quantité d'ADN incluse dans les plugs et par extension la quantité de particules virales concentrée doit être suffisamment importante. Il y a donc une amélioration à apporter aux processus d'ultrafiltration et d'ultracentrifugation qui présentent pour l'instant des rendements de récupération des virus plutôt faibles. Malgré sa faible résolution, cette technique nous a permis de détecter des changements à l'échelle spatio-temporelle. Il est dommage de n'avoir pu obtenir de profils SSCP pour les eaux brutes, afin de vérifier si la dynamique de la diversité bactérienne correspond à celle des virus. Les échantillons étant encore disponibles, de nouvelles tentatives seront effectuées.

Enfin si cette thèse s'est focalisée sur le couple virus – bactérie, les flagellés constituent avec les virus, les plus importants prédateurs des bactéries. La contribution de chacun de ces prédateurs à la mortalité bactérienne constitue un enjeu écologique important. En effet, lors des lyses virales, la biomasse bactérienne est convertie en MOD et est perdue pour les étages supérieurs du réseau trophique. Dans le cas de la prédation par les flagellés, cette biomasse va, par leur intermédiaire, remontée vers les étages supérieurs du réseau trophique.

---

## Bibliographie

**Monographie des Affaires Maritimes** (1997) Principales données administratives liées à la conchyliculture dans le quartier de Marennes-Oléron (au 01/07/1997),

**Ackermann H-W** (1987) Viruses of prokaryotes: general properties of bacteriophages, CRC press, Inc, Boca Raton, Fla

**Ackermann H-W** (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology* 154:245-251

**Adams MH** (1953) Criteria for a biological classification of bacterial viruses. *Ann NY Acad Sci* 56:442-447

**Almeida MA, Cunha MA, Alcantara F** (2001a) Factors influencing bacterial production in a shallow estuarine system. *Microb Ecol* 42:416-426

**Almeida MA, Cunha MA, Alcantara F** (2001b) Loss of estuarine bacteria by viral infection and predation in microcosm conditions. *Microb Ecol* 42:562-571

**Aminot A** (1983) Mesure des matières en suspension. In: Manuel des analyses physico-chimiques en milieu marin (Aminot A. and Chaussepied M.). C.N.E.X.O., BNDO/Documentation, Brest, p 169-175

**Auguet J-C, Montanie H, Delmas D, Hartmann HJ, Huet V** (in press) Dynamic of virioplankton abundance and its environmental control in the Charente Estuary (France). *Microb Ecol*

**Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA, Thingstad F** (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257-263

**Azam F, Fuhrman JA** (1984) measurement of bacterioplankton growth in the sea and its regulation by environmental conditions. In: Hobbie JE, Williams PJ (eds) Heterotrophic activity in the sea. Plenum Press, New York, p 179-196

**Barousseau JP** (1973) Evolution du plateau continental rochelais (golfe de Gascogne) au cours du Pliocène terminal et de l'Holocène. Les processus actuels de la sédimentation. Thèse de doctorat d'état, Université de Bordeaux I

- 
- Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Heldal M** (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340:467-468
- Berthome JP, Razet D, Garnier J** (1978) Etude hydrobiologique du bassin de Marennes-Oléron: incidences sur la reproduction de *Crassostrea gigas* en 1977. *C.I.E.M.* K33:11 p
- Bettarel Y, Amblard C, Sime-Ngando T, Carrias JF, Sargos D, Garabetian F, Lavandier P** (2003a) Viral lysis, flagellate grazing potential, and bacterial production in Lake Pavin. *Microbial ecology [Microb. Ecol.]*. 45:119-127
- Bettarel Y, Dolan JR, Hornak K, Lemee R, Masin M, Pedrotti ML, Rochelle-Newall E, Simek K, Sime-Ngando T** (2002) Strong, weak, and missing links in a microbial community of the N.W. Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology [FEMS Microbiol. Ecol.]*. 42:451-462
- Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Carrias JF, Portelli C** (2003b) Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: a seasonal study in two lakes of differing trophy. *Freshwater biology [Freshwat. Biol.]*. 48:810-822
- Billen G, Servais P, Becquevort S** (1990) Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments : bottom-up or top-down control ? *Hydrobiologia* 207:37-42
- Binder B** (1999) Reconsider the relationship between virally induced bacterial mortality and frequency of infected cells. *Aquat Microb Ecol* 18:207-215
- Boehme J, Frischer ME, Jiang SC, Kellogg CA, Pichard S, Rose JB, Steinway C, Paul JH** (1993) Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: Distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Mar Ecol Prog Ser* 97:1-10
- Bohannan JM, Lenski RE** (2000) Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecology Letters* 3:362-377
- Børsheim KY** (1993) Native marine bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol* 102:141-159
- Børsheim KY, Bratbak G, Heldal M** (1990) Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl Environ Microbiol* 56:352-356
- Bott TL** (1975) Bacterial growth rates and temperature optima in a stream with a fluctuating thermal regime. *Limnol Oceanogr* 20:191-197

- 
- Bratbak G, Egge JK, Heldal M** (1993) Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar Ecol Prog Ser* 93:39-48
- Bratbak G, Heldal M** (1995) Viruses--the new players in the game: their ecological role could they mediate genetic exchange by transduction? In: Joint I (ed) *Molecular ecology of aquatic microbes*, Vol 38. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, p 249-264
- Bratbak G, Heldal M, Norland S, Thingstad TF** (1990) Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl Environ Microbiol* 56:1400-1405
- Bratbak G, Heldal M, Thingstad TF, Tuomi P** (1996) Dynamics of virus abundance in coastal seawater. *Fems Microbiol Ecol* 19:263-269
- Bratbak G, Jacobsen A, Heldal M** (1998) Viral lysis of *Phaeocystis pouchetti* and bacterial secondary production. *Aquat Microb Ecol* 19:263-269
- Bratbak G, Thingstad TF, Heldal M** (1994) Viruses and the microbial loop. *Microb Ecol* 28:209-221
- Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F** (2002) Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14250-14255
- Campbell A** (1994a) Bacteriophage ecology, evolution and speciation. In: Webster R, Granoff A (eds) *Encyclopedia of virology*. Academic Press, Londres, p 81-83
- Campbell A** (1994b) Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu Rev Microbiol* 48:193-222
- Casamayor EO, Pedros-Alio C, Muyzer G, Amann R** (2002) Microheterogeneity in 16S Ribosomal DNA-Defined Bacterial Populations from a Stratified Planktonic Environment Is Related to Temporal Changes and to Ecological Adaptations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1706-1714
- Chao L, Levin BR, Stewart FM** (1977) A complex community in a simple habitat: An experimental study with bacteria and phage. *Ecology* 58:369-378
- Chen F, Suttle CA, Short SM** (1996) Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes. *Appl Environ Microbiol* 62:2869-2874
- Chiura HX** (1997) Generalized gene transfer by virus-like particules from marine bacteria. *Aquat Microb Ecol* 13:75-83

- 
- Chiura HX, Tagaki J** (1994) Phage-like particles production and gene transfer by marine bacteria. *Bull Jpn Soc Microb Ecol* 9:75-90
- Cochlan WP, Wikner J, Steward GF, Smith DC, Azam F** (1993) Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll *a* in neritic, oceanic and estuarine environments. *Mar Ecol Prog Ser* 92:77-87
- Cochran PK, Paul JH** (1998) Seasonal abundance of lysogenic bacteria in a subtropical estuary. *Appl Environ Microbiol* 64:2308-2312
- Corinaldesi C, Crevatin E, Del Negro P, Marini M, Russo A, Fonda-Umani S, Danovaro R** (2003) Large-scale spatial distribution of virioplankton in the Adriatic Sea: testing the trophic state control hypothesis. *Appl Environ Microbiol* 69:2664-2673
- Cottrell MT, Suttle CA** (1995) Dynamics of a lytic virus infecting the photosynthetic marine picoflagellate *Micromonas pusilla*. *Limnol Oceanogr* 40:730-739
- Cowen JP** (1992) Morphological study of marine bacterial capsules: Implications for marine aggregates. *Mar Biol* 114:85-95
- Crottereau C** (1998) Dynamique des populations bactériennes dans un marais maritime atlantique: contribution des activités ectoprotéolytiques et d'absorption des acides aminés à la production bactérienne. Thèse de doctorat, Université Aix-Marseille II
- Culley AI, Lang AS, Suttle CA** (2003) High diversity of unknown picorna-like viruses in the sea. *Nature* 424:1054-1057
- Delbès C, Moletta R, Godon JJ** (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* 2:506-515
- Delmas D, Garet MJ** (1995) SDS-preservation for deferred measurement of exoproteolytic kinetics in marine samples. *J Microbiol Methods* 22:243-248
- Delmas D, Legrand C, Bechemin C, Collinot C** (1994) Exoproteolytic activity determined by flow injection analysis: Its potential importance for bacterial growth in coastal marine ponds. *Aquatic living resources* 7:17-24
- Demuth J, Neve H, Witzel KP** (1993) Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in Lake Plußsee. *Appl Environ Microbiol* 59:3378-3384

- Ducklow HW, Carlson CA** (1992) Oceanic bacterial production. In: Marshall KC (ed) *Advances in microbial ecology*, Vol 12. Plenum press, New York, p 207-217
- Ducklow HW, Shiah FK** (1993) Estuarine bacterial production. In: Ford T (ed) *Aquatic Microbiology: An ecological approach*. Blackwell, London, p 261-284
- Duckworth DH** (1970) Biological activity of bacteriophage ghosts and 'take over' of host functions by bacteriophage. *Bact Rev* 34:344-363
- Eissler Y, Quinones RA** (2003) The effect of viral concentrate addition on the respiration rate of *Chaetoceros gracilis* cultures and microplankton from a shallow bay (Coliumo, Chile). *J Plankton Res* 25:927-938
- Eissler Y, Sahlsten E, Quinones RA** (2003) Effects of virus infection on respiration rates of marine phytoplankton and microplankton communities. *Mar Ecol Prog Ser* 262:71-80
- Evans C, Archer SD, Jacquet S, Wilson WH** (2003) Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population. *Aquat Microb Ecol* 30:207-219
- Fischer UR, Velimirov B** (2002) High control of bacterial production by viruses in a eutrophic oxbow lake. *Aquat Microb Ecol* 27:1-12
- Forde A, Fitzgerald G** (1999) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:89-113
- Frank H, Moebus K** (1987) An electron microscopic study of bacteriophages from marine waters. *Helgol Meeresunters* 41:385-414
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W** (1995) *DNA repair and mutagenesis*, ASM press, Washington
- Fuhrman JA** (1992) Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: The microbial food web. In: Falkowski PG, Woodhead A (eds) *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Plenum Press, New York, p 361-384
- Fuhrman JA** (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399:541-548
- Fuhrman JA, Azam F** (1980) Bacterioplankton secondary production estimates of coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl Environ Microbiol* 39:1085-1095

- 
- Fuhrman JA, Azam F** (1982) Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar Biol* 66:109-120
- Fuhrman JA, Griffith JF, Schwalbach MS** (2002) Prokaryotic and viral diversity patterns in marine plankton. *Ecol Res* 17:183-194
- Fuhrman JA, Noble RT** (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol Oceanogr* 40:1236-1242
- Fuhrman JA, Schwalbach M** (2003) Viral Influence on Aquatic Bacterial Communities. *Biol Bull* 204:192-195
- Fuhrman JA, Suttle CA** (1993) Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography* 6:51-63
- Furuta M, Schrader J, Schrader H, Kokjohn T, Nyaga S, McCullough A, Lloyd R, Burbank D, Landstein D, Lane L, Van Etten J** (1997) Chlorella virus PBCV-1 encodes a homolog of the bacteriophage T4 UV damage repair gene denV. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1551-1556
- Garza DR, Suttle CA** (1995) Large double-stranded DNA viruses which causes the lysis of a marine heterotrophic nanoflagellate (*Bodo sp.*) occur in natural marine communities. *Aquat Microb Ecol* 9:203-210
- Garza DR, Suttle CA** (1998) The effect of cyanophages on the mortality of *Synechococcus* spp. and selection for UV resistant viral communities. *Microb Ecol* 36:281-292
- Gasol JM, Comerma M, García JC, Armengol J, Casamayor EO, Kojacká P, Šimek K** (2002) A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnol Oceanogr* 47:62-77
- Gerba CP** (1984) Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Appl Environ Microbiol* 30:133-168
- Gerba CP, Schaiberger GE** (1975) Effect of particulates on virus survival in seawater. *J Water Pollut Control Fed* 47:93-103
- Geslin C, Le Romancer M, Gaillard M, Erauso G, Prieur D** (2003) Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents. *Research in Microbiology* 154:303-307
- Gobler CJ, Hutchins DA, Fisher NS, Coper EM, Sanudo-Wilhelmy S** (1997) Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine Chrysophyte. *Limnol Oceanogr* 42:1492-1504



- 
- Gonzalez JM, Moran MA** (1997) Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha -subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 63:4237-4242
- Gonzalez JM, Suttle CA** (1993) Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles: Ingestion and digestion. *Mar Ecol Prog Ser* 94:1-10
- Gowing MM** (2003) Large viruses and infected microeukaryotes in Ross Sea summer pack ice habitats (vol 142, pg 1029, 2003). *Marine Biology* 143:209
- Gras P, Comps M, David A, Baron G** (1971) Observations préliminaires sur la reproduction des huîtres dans le bassin de Marennes-Oléron en 1971. *Science et Pêches, Bull. Inst. Pêches Marit.* 207:16
- Guixa-Boixareu N, Calderon-Paz JI, Heldal M, Bratbak G, Pedros-Alio C** (1996) Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquat Microb Ecol* 11:215-227
- Guixa-Boixereu N, Vaque D, Gasol JM, Sanchez-Camara J, Pedros-Alio C** (2002) Viral distribution and activity in Antarctic waters. *Deep Sea Research* 49:4-5
- Hara S, Koike I, Terauchi K, Kamiya H, Tanoue E** (1996) Abundance of viruses in deep oceanic waters. *Mar Ecol Prog Ser* 145:269-277
- Hara S, Terauchi K, Koike I** (1991) Abundance of viruses in marine waters: Assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2731-2734
- Heissenberger A, Leppard GG, Herndl GJ** (1996a) Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:4521-4528
- Heissenberger A, Leppard GG, Herndl GJ** (1996b) Ultrastructure of marine snow. 2. Microbiological considerations. *Mar Ecol Prog Ser* 135:299-308
- Heldal M, Bratbak G** (1991) Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar Ecol Prog Ser* 72:205-212
- Hendrix RW, Smith MCM, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF** (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2192-2197
- Hennes KP, Simon M** (1995) Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 61:333-340

- 
- Hennes KP, Suttle CA, Chan AM** (1995) Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 61:3623-3627
- Herrmann JE, Kostenbader KD, Jr., Cliver DO** (1974) Persistence of enteroviruses in lake water. *Appl Microbiol* 28:895-896
- Hewson I, JM ON, Heil CA, Bratbak G, Dennison WC** (2001a) Effects of concentrated viral communities on photosynthesis and community composition of co-occurring benthic microalgae and phytoplankton. *Aquat Microb Ecol* 25:1-10
- Hewson I, O'Neil JM, Dennison WC** (2001b) Virus-like particles associated with *Lyngbya majuscula* (Cyanophyta; Oscillatoriaceae) bloom decline in Moreton Bay, Australia. *Aquatic Microbial Ecology* [Aquat. Microb. Ecol.]. 25:207-213
- Hewson I, O'Neil JM, Fuhrman JA, Dennison WC** (2001c) Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries. *Limnol Oceanogr* 46:1734-1746
- Hofer JS, Sommaruga R** (2001) Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: importance of filamentous forms. *Aquat Microb Ecol* 26:1-11
- Hollibaugh JT, Azam F** (1983) Microbial degradation of dissolved proteins in sea water. *Limnol Oceanogr* 28:1104-1116
- Hoppe HG** (1983a) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar Ecol Prog Ser* 11:299-308
- Hoppe HG** (1983b) Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: Measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar Ecol Prog Ser* 11:299-308
- Hurst CJ** (2000) An introduction to viral taxonomy and the proposal of Akamara, a potential domain for the genomic acellular agents. *Viral Ecology*:41-62
- Huxley HE** (1956) Some observations on the structure of tobacco mosaic virus Proc European Regional Conf Electron Microscopy, Stockholm
- Hwang C, Cho B** (2002) Virus-infected bacteria in oligotrophic open waters of the east sea, Korea. *Aquat Microb Ecol* 30:1-9

- 
- Jensen EC, Schrader HS, Rieland B, Thompson TL, Lee KW, Nickerson KW, Kokjohn TA** (1998) Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:575-580
- Jiang SC, Paul JH** (1994) Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar Ecol Prog Ser* 104:163-172
- Jiang SC, Paul JH** (1998) Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 64:2780-2787
- Kim Juniper S, Bird DF, Summit M, Vong MP, Baker ET** (1998) Bacterial and viral abundances in hydrothermal event plumes over northern Gorda Ridge. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 45:2739-2749
- Kirchman DL, Hoch MP** (1988) Bacterial production in the Delaware Bay estuary estimated from thymidine and leucine incorporation rates. *Mar Ecol Prog Ser* 45:169-178
- Kirchman DL, Keil RG, Simon M, Welschmeyer NA** (1993) Biomass and production of heterotrophic bacterioplankton in the oceanic subarctic Pacific. *Deep-Sea Res* 40:967-988
- Klieve A, Swain R** (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Appl Environ Microbiol* 59:2299-2303
- Kokjohn TA** (1989) Transduction: Mechanism and potential for gene transfer in the environment. In: Levy SB, Miller RV (eds) *Gene transfer in the environment*. McGraw-Hill, New York, p 73-93
- Kokjohn TA, Sayler GS, Miller RV** (1991) Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. *J Gen Microbiol* 47:855-874
- Kolter RD, Siegele A, Tormo A** (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 47:855-874
- Lammers WT** (1992) Stimulation of bacterial cytokinesis by bacteriophage predation. *Hydrobiologia* 235/236:261-265
- Larsen A, Castberg T, Sandaa RA, Brussaard CPD, Egge J, Heldal M, Paulino A, Thyrrhaug R, Hannen E, Bratbak G** (2001) Population dynamics and diversity of phytoplankton, bacteria and viruses in a seawater enclosure. *Mar Ecol Prog Ser* 221:47-57

- 
- Lebaron P, Servais P, Agogue H, Courties C, Joux F** (2000) Does the high nucleic acid content of individual bacteria cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Appl Environ Microbiol* 67:1775-1782
- Lebaron P, Servais P, Baudoux AC, Bourrain M, Courties C, Parthuisot N** (2002) Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquat Microb Ecol* 28:131-140
- (1973) Le phytoplancton des eaux superficielles du bassin de Marennes-Oléron et son incidence sur l'alimentation des huîtres, *Rapport I.S.T.P.M*
- Lee D, Zo Y, Kim S** (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3112-3120
- Lee S, Fuhrman JA** (1987) Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 53:1298-1303
- Legendre P, Legendre L** (1998) *Numerical Ecology*, Elsevier science, Amsterdam
- Lenski RE** (1988) Dynamics of interactions bacteria and virulent bacteriophage. *Adv Microb Ecol* 15:99-108
- Letellier L, Boulanger P, de Frutos M, Jacquot P** (2003) Channeling phage DNA through membranes: from in vivo to in vitro. *Res Microb* 154:283-287
- Levin BR, Stewart FM, Chao L** (1977) Resource-limited growth, competition, and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage. *Am Nat* 111:3-24
- Lovell CR, Konopka A** (1985) The effects of temperature on bacterial production in a dimictic eutrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* 31:135-140
- Maranger R, Bird DF** (1995) Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters. *Mar Ecol Prog Ser* 121:217-226
- Maranger R, Bird DF** (1996) High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Quebec. *Microb Ecol* 31:141-151
- Maranger R, Bird DF, Juniper SK** (1994) Viral and bacterial dynamics in arctic sea ice during the spring algal bloom near Resolute, N.W.T., Canada. *Mar Ecol Prog Ser* 111:121-127

- Massana R, Pedrós-Alió C, Casamayor EO, Gasol JM** (2001) Changes in marine bacterioplankton phylogenetic composition during incubations designed to measure biogeochemically significant parameters. *Limnol Oceanogr* 46:1181-1188
- Mathias CB, Kirschner AKT, Velimirov B** (1995) Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River. *Appl Environ Microbiol* 61:3734-3740
- Matthews REF** (1980) Classification et nomenclature des virus. Troisième rapport du comité international de taxonomie des virus, Masson, Paris.
- McLusky DS** (1989) *The Estuarine Ecosystem*, Blakie, Glasgow and London
- Middelboe M** (2000) Bacterial growth rate and marine virus-host dynamics. *Microb Ecol* 40:114-124
- Middelboe M, Hagstrom A, Blackburn N, Sinn B, Fischer U, Borch NH, Pinhassi J, Simu K, Lorenz MG** (2001) Effects of bacteriophages on the population dynamics of four strains of pelagic marine bacteria. *Microb Ecol* 42:395-406
- Middelboe M, Jorgensen NOG, Kroer N** (1996) Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 62:1991-1997
- Middelboe M, Lyck PG** (2002) Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquat Microb Ecol* 27:187-194
- Moebus K** (1987) Ecology of marine bacteriophages. In: Goyal SM, Gerba CP, Bitton G (eds) *Phage ecology*. John Wiley and Sons, New York, p 136-156
- Moebus K** (1992) Further investigations on the concentration of marine bacteriophages in the water around Helgoland, with reference to the phage-host systems encountered. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 46:275-292
- Montanié H, Hartmann HJ, Crottereau C, Trichet C** (2002) Virus Like Particle analysis in a seston-rich coastal pond using Transmission Electron Microscopy. *Aquat Microb Ecol* 28:105-115
- Moriarty DJW** (1986) Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. In: Overbeck J, Chrost RJ (eds) *Aquatic Microbial Ecology: biochemical and molecular approaches*. Springer-Verlag, New York, p 8-46

- Murray AG** (1995) Phytoplankton exudation: Exploitation of the microbial loop as a defence against algal viruses. *J Plankton Res* 17:1079-1094
- Murray AG, Jackson GA** (1992) Viral dynamics: A model of the effects of size, shape, motion and abundance of single-celled planktonic organisms and other particles. *Mar Ecol Prog Ser* 89:103-116
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
- Noble RT, Fuhrman JA** (1997) Virus decay and its causes in coastal waters. *Appl Environ Microbiol* 63:77-83
- Noble RT, Fuhrman JA** (1998) Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol* 14:113-118
- Noble RT, Fuhrman JA** (1999) Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products. *Aquat Microb Ecol* 1:1-11
- Noble RT, Fuhrman JA** (2000) Rapid virus production and removal as measured with fluorescently labeled viruses as tracers. *Appl Environ Microbiol* 66:3790-3797
- Noble RT, Middelboe M, Fuhrman JA** (1999) Effects of viral enrichment on the mortality and growth of heterotrophic bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* 1:1-13
- Pages J, Gadel F** (1990) Dissolved organic matter and UV absorption in a tropical hyperhaline estuary. *Sci. total Environment* 99:173-204
- Pages J, Torreton JP, Sempere R** (1997) Dissolved organic carbon in coral reef lagoons, by high temperature catalytic oxidation and UV spectrometry. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser 2a* 324:915-922
- Palumbo AV, Ferguson RL** (1978) Distribution of suspended bacteria in the Newport River Estuary, North Carolina. *Estuarine Coast Mar Sci* 7:251-259
- Paul JH, Jiang SC, Rose JB** (1991) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl Environ Microbiol* 57:2197-2204
- Paul JH, Rose JB, Jiang SC, Kellogg CA, Dickson L** (1993) Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Appl Environ Microbiol* 59:718-724

- Paul JH, Sullivan MB, Segall AM, Rohwer F** (2002) Comparative biochemistry and physiology. *Biochem Mol Biol* 133:463-476
- Peduzzi P, Weinbauer MG** (1993a) Effect of concentrating the virus-rich 2-200-nm size fraction of seawater on the formation of algal flocs (marine snow). *Limnol Oceanogr* 38:1562-1565
- Peduzzi P, Weinbauer MG** (1993b) The submicron size fraction of seawater containing high numbers of virus particles as bioactive agent in unicellular plankton community successions. *Journal of Plankton Research* 15:1375-1386
- Pesan BF, Weinbauer MG, Peduzzi P** (1994) Significance of the virus-rich 2-200 nm size fraction of seawater for heterotrophic flagellates: 1. Impact on growth. *Mar Ecol* 15:281-290
- Pomeroy LR** (1974) The ocean's food web, a changing paradigm. *Bio-Science* 24:499-504
- Pouliquen M** (1975) Etude minéralogique et géochimique des sédiments du littoral vendéo-charentais et de la vasière Ouest-Gironde (France): application à la connaissance de l'origine et à la dynamique des vases dans la baie de Marennes-Oléron. thèse de 3e cycle, Université de Bordeaux I
- Prieur D, Troussellier M, Romana A, Chamroux S, Mevel G, Baleux B** (1987) Evolution of bacterial communities in the Gironde Estuary (France) according to a salinity gradient. *Est Coast Shelf Sci* 24:95-108
- Pritchard DW** (1967) What is an estuary: a physical viewpoint. In: Lauff GH (ed) *Estuaries*, Vol 83. American Association for the Advancement of Science, p 3-5
- Proctor LM** (1997) Advances in the study of marine viruses. *Microsc Res Tech* 37:136-161
- Proctor LM, Fuhrman JA** (1990) Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* 343:60-62
- Proctor LM, Fuhrman JA** (1991) Roles of viral infection in organic particle flux. *Mar Ecol Prog Ser* 69:133-142
- Proctor LM, Fuhrman JA** (1992) Mortality of marine bacteria in response to enrichments of the virus size fraction from seawater. *Mar Ecol Prog Ser* 87:283-293
- Proctor LM, Fuhrman JA, Ledbetter MC** (1988) Marine bacteriophages and bacterial mortality. *Eos* 69:1111-1112

- Proctor LM, Okubo A, Fuhrman JA** (1993) Calibrating estimates of phage induced-mortality in marine bacteria: ultrastructural studies of marine bacteriophage development from one-step growth experiments. *Microb Ecol* 25:161-182
- Propst-Ricciuti C** (1976) The effect of host-cell starvation on virus-induced lysis by MS2 bacteriophage. *J Gen Virol* 31
- Ravail-Legrand B** (1993) Incidence des débits de la Charente sur la capacité biotique du bassin de Marennes-Oléron. PhD thesis, Université de Nantes
- Revilla M, Iriarte A, Madariaga I, Orive E** (2000) Bacterial and Phytoplankton Dynamics along a Trophic Gradient in a Shallow Temperate Estuary. *Est Coast Shelf Sci* 50:297-313
- Riemann L, Middelboe M** (2002) Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquat Microb Ecol* 27:219-232
- Riemann L, Steward GF, Azam F** (2000) Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl Environ Microbiol* 2:578-587
- Riera P** (1995) Origine et devenir de la matière organique dans un écosystème estuarien à vocation conchylicole. Utilisation du traçage isotopique naturel. PhD thesis, Université de Bordeaux I
- Safferman RS, Diener TO, Desjardins PR, Morris ME** (1972) Isolation and characterization of AS-1, a phycovirus infecting the blue-green algae, *Anacystis nidulans* and *Synechococcus cedrorum*. *Virology* 47:105-113
- Safferman RS, Morris ME** (1963) Algal virus: isolation. *Nature* 140:679-680
- Sano E, Carlson S, Wegley L, Rohwer F** (2004) Movement of Viruses between Biomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5842-5846
- Saye DJ, Ogunseitan OA, Saylor GS, Miller RV** (1990) Transduction of linked chromosomal genes between *Pseudomonas aeruginosa* strains during incubation in situ in a freshwater habitat. *Appl Environ Microbiol* 56:140-145
- Schultz GE, Ducklow H** (2000) Changes in bacterioplankton metabolic capabilities along a salinity gradient in the York River estuary, Virginia, USA. *Aquat Microb Ecol* 22:163-174
- Schwalbach MS, Fuhrman JA** (2004) Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms. *Aquat Microb Ecol* 34:117-127



- 
- Scola BL, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie J-M, Raoult D** (2003) A Giant Virus in Amoebae. *Science* 299:2033-
- Seitzinger SP, Sanders RW** (1997) Contribution of dissolved organic nitrogen from rivers to estuarine eutrophication. *Mar Ecol Prog Ser* 159:1-12
- Servais P, Casamayor EO, Courties C, Catala P, Parthuisot N, Lebaron P** (2003) Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat Microb Ecol* 33:41-51
- Shaffer JJ, Jacobsen LM, Schrader JO, Lee KW, Martin EL, Kokjohn TA** (1999) Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage UNL-1, a Bacterial Virus with a Novel UV-A-Inducible DNA Damage Reactivation Phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2606-2613
- Shiah FK, Ducklow HW** (1994) Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 103:297-308
- Short CM, Suttle CA** (2005) Nearly Identical Bacteriophage Structural Gene Sequences Are Widely Distributed in both Marine and Freshwater Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:480-486
- Simek K, Kojecká P, Nedoma Ja, Hartman P, Vrba J, Dolan JR** (1999) Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography* 44:1634-1644
- Sorokin YL** (1971) Bacterial populations as components of oceanic ecosystems. *Mar Biol* 11:101-105
- Spencer R** (1955) A marine bacteriophage. *Nature* 175:690-691
- Staley C, Konopka A** (1985) Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39:321-346
- Stent GS** (1963) *Molecular biology of bacterial viruses*, Freeman and Company, San Francisco
- Steward G, Montiel J, Azam F** (2000) Genome size distributions indicate variability and similarities among marine assemblages from diverse environments. *Limnol Oceanogr* 45:1697-1706
- Steward GF, Smith DC, Azam F** (1996) Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Seas. *Mar Ecol Prog Ser* 131:287-300
- Steward GF, Wikner J, Cochlan WP, Smith DC, Azam F** (1992) Estimation of virus production in the sea: 2. Field results. *Mar. Microb. Food Webs.* 6:79-90

- 
- Stoderegger K, Herndl GJ** (1998) Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 43:877-884
- Stopar D, Cerne A, Zigman M, Poljsak-Prijatelj M, Turk V** (2003) Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microb Ecol* 46:249-256
- Strickland JDH, Parsons TR** (1972) A practical handbook of seawater analysis, Bull Fish Res Board Can
- Suttle CA** (1992) Inhibition of photosynthesis in phytoplankton by the submicron size fraction concentrated from seawater. *Mar Ecol Prog Ser* 87:105-112
- Suttle CA** (1994) The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb Ecol* 28:237-243
- Suttle CA** (1999) The ecological, evolutionary and geochemical consequences of viral infection of cyanobacteria and eukaryotic algae. In: Hurst C (ed) *Viral Ecology*. Academic Press, New York
- Suttle CA** (2000) Cyanophages and their role in the ecology of cyanobacteria. In: Whitton B, Potts M (eds) *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p 563-589
- Suttle CA, Chan AM** (1993) Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus* : Abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Mar Ecol Prog Ser* 92:99-109
- Suttle CA, Chan AM** (1994) Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus spp.* *Appl Environ Microbiol* 60:3167-3174
- Suttle CA, Chan AM, Cottrell MT** (1990) Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* 347:467-469
- Suttle CA, Chen F** (1992) Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl Environ Microbiol* 58:3721-3729
- Tabachnick BG, Fidell LS** (2001) Using multivariate statistics, 3th edition, Allyn and Bacon
- Tapper MA, Hicks RE** (1998) Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton. *Limnol Oceanogr* 43:95-103
- Tesson M** (1973) Aspects dynamiques de la sédimentation dans la baie de Marennes-Oléron (France). thèse de doctorat d'état, Université de Bordeaux I
-

- 
- Thingstad TF** (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol Oceanogr* 45:1320-1328
- Thingstad TF, Heldal M, Bratbak G, Dundas I** (1993) Are viruses important partners in pelagic food webs? *Trends Ecol Evol* 8:209-212
- Thingstad TF, Lignell R** (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat Microb Ecol* 13:19-27
- Torrella F, Morita RY** (1979) Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Appl Environ Microbiol* 37:774-778
- Troussellier M, Schafer H, Batailler N, Bernard L, Courties C, Lebaron P, Muyzer G, Servais P, Vives Rego J** (2002) Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquat Microb Ecol* 28:13-24
- Tuomi P, Fagerbakke KM, Bratbak G, Heldal M** (1995) Nutritional enrichment of a microbial community: The effects on activity, elemental composition, community structure and virus production. *FEMS Microbiol Ecol* 16:123-134
- Tuomi P, Kuuppo P** (1999) Viral lysis and grazing loss of bacteria in nutrient- and carbon-manipulated brackish water enclosures. *J Plankton Res* 21:923-937
- Tuomi P, Torsvik T, Heldal M, Bratbak G** (1997) Bacterial population dynamics in a meromictic lake. *Appl Environ Microbiol* 63:2181-2188
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM** (2000) Progres en taxonomie virale  
Advances in viral taxonomy. *Virologie Montrouge* 4:29-37
- Waterbury JB, Valois FW** (1993) Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl Environ Microbiol* 59:3393-3399
- Weibe WJ, Liston J** (1968) Isolation and characterization of a marine bacteriophage. *Mar Biol* 1:244-249
- Weinbauer M, Höfle M** (1998) Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton in a heutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 64:431-438
- Weinbauer MG** (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* 28:127-181

- 
- Weinbauer MG, Fuks D, Peduzzi P** (1993) Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic Sea. *Appl Environ Microbiol* 59:4074-4082
- Weinbauer MG, Fuks D, Puskaric S, Peduzzi P** (1995) Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the northern Adriatic Sea. *Microb Ecol* 30:25-41
- Weinbauer MG, Peduzzi P** (1994) Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes. *Mar Ecol Prog Ser* 108:11-20
- Weinbauer MG, Peduzzi P** (1995a) Effect of virus-rich high molecular weight concentrates of seawater on the dynamics of dissolved amino acids and carbohydrates. *Mar Ecol Prog Ser* 127:245-253
- Weinbauer MG, Peduzzi P** (1995b) Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in the northern Adriatic Sea. *J Plankton Res* 17:1851-1856
- Weinbauer MG, Suttle CA** (1996) Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 62:4374-4380
- Weinbauer MG, Wilhelm SW, Suttle CA, Garza DR** (1997) Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine virus communities. *Appl Environ Microbiol* 63:2200-2205
- White PA, Kalf J, Rasmussen JB, Gasol JM** (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb Ecol* 21:99-118
- Wichels A, Biel SS, Gelderblom HR, Brinkhoff T, Muyzer G, Schutt C** (1998) Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 64:4128-4133
- Wiggins BA, Alexander M** (1985) Minimum bacterial density bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 49:19-23
- Wilcox RM, Fuhrman JA** (1994) Bacterial viruses in coastal seawater: Lytic rather than lysogenic production. *Mar Ecol Prog Ser* 114:35-45
- Wilhelm SW, Brigden SM, Suttle CA** (2002) A dilution technique for the direct measurement of viral production: A comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microb Ecol* 43:168-173
- Wilhelm SW, Suttle CA** (1999) Viruses and Nutrient Cycles in the Sea. *Bioscience* 49:781-788
- Wilhelm SW, Weinbauer MG, Suttle CA, Jeffrey WH** (1998a) The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea. *Limnol Oceanogr* 43:586-592

- 
- Wilhelm SW, Weinbauer MG, Suttle CA, Pledger RJ, Mitchell DL** (1998b) Measurements of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective. *Aquat Microb Ecol* 14:215-222
- Wilson WH, Carr NG, Mann NH** (1996) The effect of phosphate status on the kinetics of cyanophage infection in the oceanic cyanobacterium *Synechococcus sp.* WH7803. *J Phycol* 32:506-516
- Wilson WH, Fuller NJ, Joint IR, Mann NH** (1999) Analysis of cyanophage diversity and population structure in a south-north transect of the Atlantic Ocean, *Musee oceanographique, Monaco*
- Winter C, Smit A, Herndl GJ, Weinbauer MG** (2004) Impact of Virioplankton on Archaeal and Bacterial Community Richness as Assessed in Seawater Batch Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:804-813
- Wintzingerode FV, Goebel UB, Stackebrandt E** (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21:213-229
- Wommack K, Ravel J, Hill R, Chun J, Colwell R** (1999a) Population dynamics of Chesapeake Bay virioplankton : total-community analysis by pulsed field electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65:231-240
- Wommack KE, Colwell RR** (2000) Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:69-114
- Wommack KE, Hill RT, Kessel M, Russek-Cohen E, Colwell RR** (1992) Distribution of viruses in the Chasepeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 58:2965-2970
- Wommack KE, Hill RT, Muller TA, Colwell RR** (1996) Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl Environ Microbiol* 62:1336-1341
- Wommack KE, Ravel J, Hill RT, Colwell RR** (1999b) Hybridization analysis of Chesapeake Bay virioplankton. *Appl Environ Microbiol* 65:241-250
- Yentsch CS, Menzel DW** (1963) A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res* 10:221-231
- Yokokawa T, Nagata T, Cottrell MT, Kirchman DL** (2004) Growth rate of the major phylogenetic bacterial groups in the Delaware estuary. *Limnol Oceanogr*
- Zar JH** (1999) *Biostatistical analysis*, 4th edn Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ

**Zhong Y, Chen F, Wilhelm SW, Poorvin L, Hodson RE** (2002) Phylogenetic Diversity of Marine Cyanophage Isolates and Natural Virus Communities as Revealed by Sequences of Viral Capsid Assembly Protein Gene g20. *Appl Environ Microbiol* 68:1576-1584

**Zobell CE** (1943) The effects of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol*:39-56

**Zubkov MV, Fuchs BM, Burkill PH, Amann R** (2001) Comparison of Cellular and Biomass Specific Activities of Dominant Bacterioplankton Groups in Stratified Waters of the Celtic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5210-5218