HAL
open science

Impacts de la contamination multiple en éléments traces métalliques sur les communautés microbiennes dans un environnement côtier fortement anthropisé : la rade de Toulon

Clément Coclet

To cite this version:

Clément Coclet. Impacts de la contamination multiple en éléments traces métalliques sur les communautés microbiennes dans un environnement côtier fortement anthropisé : la rade de Toulon. Ecotoxicologie. Université de Toulon, 2019. Français. NNT : 2019TOUL0010 . tel-02494822

HAL Id: tel-02494822

https://theses.hal.science/tel-02494822v1

Submitted on 29 Feb 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE 548 – MER & SCIENCES

INSTITUT MÉDITERRANÉEN D'OCÉANOLOGIE (MIO)

MATERIAUX POLYMERES INTERFACES ENVIRONNEMENT MARIN (MAPIEM)

THÈSE présentée par :

Clément Coclet

Soutenue le : **26 juin 2019**

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Écologie microbienne

Impacts de la contamination multiple en éléments traces métalliques sur les communautés microbiennes dans un environnement côtier fortement anthropisé : la rade de Toulon

THÈSE dirigée par :

M. Jean-François Briand	Maître de conférence, UTLN	Co-Directeur de thèse
M. Benjamin Misson	Maître de conférence, UTLN	Co-Directeur de thèse
M. Cédric Garnier	Maître de conférence, UTLN	Directeur de thèse

JURY :

M. Ahmed Tlili	Chargé de recherche, Eawag, Suisse	Rapporteur
M. Robert Duran	Pr. Des Universités, UPPA	Rapporteur
Mme Sabine Stachowski-Haberkorn	Docteur, IFREMER	Examinateur
M. Gérald Grégori	Chargé de Recherche, MIO	Examinateur
M. Jean-François Briand	Maître de conférences, UTLN	Co-Directeur de thèse
M. Benjamin Misson	Maître de conférences, UTLN	Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie le Dr. Stéphane Mounier (ancien directeur de PROTEE), le Dr. Richard Sempere (directeur de MIO) et le Pr. Jean-François Chailan (directeur MAPIEM) pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ces laboratoires. Je remercie également la région PACA et Toulon Provence Métropole (TPM) pour l'attribution de cette bourse de thèse.

Je remercie les membres du jury. Je remercie le Dr. Ahmed Tlili et Pr. Robert Duran pour avoir accepté de corriger ce travail. Je remercie la Dr. Sabine Stachowski-Haberkorn et le Dr. Gérald Grégori pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens ensuite particulièrement à remercier mes co-directeurs de thèse, le Dr. Jean-François Briand et le Dr. Benjamin Misson pour avoir encadrer cette thèse de manière formidable, pour leur confiance et pour leurs conseils et leur enthousiasme tout au long de cette thèse. J'ai pu apprendre beaucoup à vos côtés. Merci Jeff pour ton soutien sans faille notamment sur la fin, pour tes conseils et encouragements sans lesquels il aurait été beaucoup plus difficile de terminer cette thèse avec un bonne santé mentale. Au-delà de l'aspect scientifique, j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi. Enfin, j'espère qu'on aura l'occasion de participer à d'autres congrès ensemble et partager de bons moments autour d'une bonne bouteille de vin. Merci Ben pour avoir encadré cette thèse, pour tes corrections toujours très (trop ?) complètes et justes, pour ton sens poussé de la recherche et pour ton intérêt sans faille à mes travaux de thèse. Je suis ton premier doctorant. Je te le dis, c'est un honneur d'avoir pu travailler avec toi. J'espère avoir été à la hauteur et te souhaite d'encadrer encore beaucoup de doctorants, avec la même énergie que tu as mis pour ma thèse (il n'y a pas de raison que je sois le seul à en avoir chié :p). Encore un grand merci à vous deux.

Maintenant que les remerciements classiques ont été fait, je me dois de remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Merci beaucoup, du fond du cœur. Et je m'arrêterais là. Maintenant laissez-moi dormir (il est 3h du matin au moment où je vous parle).

Fin.

Plus tard dans la nuit...

Franchement ? Je n'avais pas envie de l'écrire cette putain[1] de partie remerciement. Quoi ? Je viens d'écrire 400 pages en 2 mois et vous voulez que je continue à écrire, au dépend de mon sommeil, si rare depuis quelques temps ? J'aurais préféré remercier chacun d'entre vous de vive voix, autour d'une bouteille. Ce devrait être comme ça des remerciements en bonne et due forme. Les vrais savent. Mais bon puisqu'il faut le faire… je vais tenter d'y mettre de la bonne volonté et de la bonne humeur (ce qui me caractérise, vous en conviendrez…). Non, mais entre nous, faut être dingo pour avoir envie de faire des remerciements avec tout plein d'enthousiasme ! C'est pas humain après une épreuve pareille de réagir comme ça ! Bon je digresse encore…

Je vais essayer d'oublier personne… Puis si j'oublie quelqu'un, allez voir dans les remerciements à la fin des articles de cette thèse. Vous y serez peut-être. Puis si là aussi vous n'y êtes pas et que vous n'êtes pas content, venez me voir. Je vous payerais un coup. Allez c'est partie…

Merci à tous les membres (actuels et passés) de l'ancien laboratoire PROTEE, maintenant MIO pour la bonne ambiance de travail et l'atmosphère particulière qui règne là-bas. Dans le désordre et par ordre d'arrivé dans mon cerveau : merci à Stéph (change surtout pas !), Jean-Louis, Dominique, Bruno, Émilie, Roland, Natacha, Martino (faut que t'arrêtes avec le syndicalisme, sérieux :p), Benjamin (le Oursel), Marie-Christine, Amonda, Christophe, Ayoub, Houssam, Stéphane Coupé, Sandrine Gaillard, Nathalie et Nathalie et Simone. Certains m'ont aidé durant ma thèse et je les en remercie. Les autres, merci et ne changeaient pas.

Puis il y a bien sur mes copaings. Ceux qui ont fait que je suis parti de ce laboratoire pour finir ma thèse à MAPIEM car je n'arrivais plus à travailler avec eux autour. Seb, franchement du fond du cœur MERCI !! Je n'aurais jamais pu faire une thèse aussi aboutie sans toi. T'es chiant, t'es le pire des râleurs, t'es un emmerdeur mais putain merci de ton aide et du boulot qu'on a fait ensemble… où juste toi (parce que bah je suis doctorant et toi ingénieur… quoi ! (blague)). Merci pour tout, vraiment ! Cyril et Nico (j'ai pas pu vous séparer), vous êtes géniaux. Merci pour être là tout simplement. J'ai eu de la chance de partager ces années de thèse avec vous. Vous formez un beau couple, j'espère que ça durera et puis même si je suis loin, pensez à m'inviter à votre mariage. Juste Cyril, désolé d'avoir essayé de te faire l'amour… Youssef, merci pour ta gentillesse et pour venir au foot avec moi (stp fais des passes…). Martin, mon canadien ! Toi tu me manques beaucoup ! Ça a été fusionnel entre nous, dès le début. Que de souvenirs avec toi, de soirées, de délires, de découvertes (le Ricard pour toi notamment). J'espère te voir très bientôt !! Gaël, Le DUDU ! T'es un mec génial (pas comme les povr' types que j'ai décrit juste avant). Je vais regretter de ne plus te croiser et passez des moments avec toi (même rares ces derniers temps). En revanche, compte plus sur moi pour tes putains de missions terrains. T'es un escroc ! Puis Véro, je n'ai pas de mot. Merci pour tout, pour ta joie, ta bonne humeur, ton rire, ta disponibilité, tes corrections. Fais un gros bisou aux enfants ! T'es une belle personne.

---

[1] Putain : expression marseillaise qui sert de virgule ou de ponctuation.

Puis il y a mon deuxième labo, MAPIEM. Tout pareil que pour MIO. Dans le désordre et par ordre d'arrivé dans mon cerveau : merci à Jean-François Chailan (je t'avais dit que je resterais 2 mois puis je suis resté 1 an et demi !) toujours prêt à soudoyer un jury pour faire gagner ces doctorants, c'est remarquable ! merci à Gégé et Annick pour votre sympathie et votre bonne humeur, à Raph, à Catherine (torture pas trop William, c'est un petit-être fragile), Anne, Marlène (quand je partirais je balancerais toutes les conneries qu'on fait les gens dans les labos tkt hashtag gestapo), Xavier, et Bruno.

Puis là encore, il y a les amis de MAPIEM. Isis, Elora, Margaux, Manu (El commandante), Lina (tu me manques beaucoup, essaye de revenir un peu parce que moi je n'irais pas dans le Nord…), Elisa. Laure… on est né le même jour et on est pareil. C'est à quitte ou double. Parfois, je t'adore et parfois tu me sors par les yeux. Putain qu'est-ce que t'es chiante parfois ! Même pour écrire cette partie, tu me soule. Je n'arrête pas de me demander bon qu'est-ce que je dois écrire pour lui faire plaisir, qu'elle le prenne pas mal… etc… Alors voilà t'es chiante, t'es une peau-de-vache mais je t'aime comme ça. Change pas. Vitalys, j'ai pris des actions pour le KFC gabonais. Je crois en ton projet fou ! Benoit, t'es africain albinos mais je t'aime bien quand même. Puis rappelle-toi, fais-toi passer pour plus bête que tu ne l'es pour pas que Jeff te fasse trop chier pour la thèse ! Nathan, l'élu. Je fonde beaucoup d'espoir en toi pour prendre ma relève. Prends soin de la tasse à café et perpétue cette tradition. Will-I-Am ou Wiwi, pfff je sais pas quoi dire. T'es un peu bizarre comme type mais on t'aime pour ça. Toi aussi changes pas et bon courage pour la fin de thèse. On a commencé ensemble, on finit ~~ensemble~~, ahh non toi tu finis plus tard, pardon. Mais tu vas le faire et avec la manière !

Puis il y a les anciens, les amis de la première heure qui m'ont accepté quand je n'étais qu'un stagiaire qui raconte des histoires bizarres… Aurélie, Laurie et Richard ! Merci et vous me manquez tous les trois, beaucoup ! Laurie, je ne pense pas que j'ai besoin d'en écrire des tonnes pour que tu saches à quel point t'es importante pour moi. Donc merci pour tout. Richard, toi par contre je pourrais en écrire des tonnes mais ça pourrait être gênant et inapproprié, ici. Donc je vais essayer de rester mesuré. On n'était pas fait pour être ami, puis au final… voilà : une grande amitié ! On aura pleins d'histoires à raconter à nos petits-enfants. Puis tu sais si bien les raconter en plus… Comme celle aux champignons, tu te souviens quand tu as eu un problème gas BIP BIP BIP ou la fois où t'as rencontré cette fille qui … Non celle-là on ne peut pas le raconter ici. Ni même à tes petits-enfants, d'ailleurs ! Bon pour ceux que ça intéresse, j'ai répertorié toutes tes histoires sur un site : www.les-petites-histoires-de-Richard.fr. Et au fait, désolé pour ta dent et pour la mort de ton poisson, c'est un peu ma faute.

Puis il y a tous les autres, des amis, certains perdus de vue durant cette thèse mais qui sont toujours dans mes pensées : Oriane, Christelle, Nico & Julia, vos enfants (Maël et Lucy), Clém (j'aurais pu faire un paragraphe sur toi), Joris, Jules, Gros Laoul, Seb, Sarah. J'en oublie surement, désolé.

Enfin, ma famille. Mes parents. Papa, Maman. Merci d'être là pour moi. De m'avoir toujours soutenu dans mes projets, de m'avoir aidé. J'espère que je vous rends fier. J'essaye de tout faire dans ce sens, en tout cas. Toutes ces études et cette thèse, c'est pour vous, pour vous rendre fier et vous rendre tout

ce que vous m'avez apporté, depuis tout petit. (Sinon, j'aurais fait de la cuisine :p, je vais peut-être commencer d'ailleurs). Il a fallu que je fasse et que j'écrive une thèse pour vous dire que je vous aime. On ne se le dit pas beaucoup mais je vous aime ! Mes grands-parents (Papi, Mamie Christiane, Mamie Jo, et Francis), ma sœur, Franck et Kama, je vous aime tous très fort.

Sara. Mi amorcita, mi malcriadita. Je n'y serais pas arrivé sans toi. Merci de m'avoir soutenu dans ces moments où je n'ai pas toujours été le plus simple des copains. J'ai beaucoup de chance de t'avoir dans ma vie. Pour longtemps, pour toujours. Te amo. Mucho. Muchissimo. Muchississimo.

Enfin, le plus dur. Je redoutais d'arriver à ce paragraphe. Cédric. Les mots sont lourds et peine à apparaitre sur cette page blanche. Il y aurait mille façons d'écrire ce que j'ai sur le cœur. Aucune ne pourra le retranscrire parfaitement. Et c'est tant mieux, c'est au fond de moi, à jamais marqué dans mon être. Alors, je vais seulement espérer t'avoir rendu fier par mon travail. Chaque jour de travail, chaque résultat, chaque partie, chaque page, chaque mot de cette thèse est pour toi. Le reste, je le garde pour moi.

Finalement... Voila. J'ai mis de l'enthousiasme dans ces remerciements et j'ai pris du plaisir à penser à chacun de vous. Je suis peut-être dingo, surement même !

à Cédric,

un mentor, un modèle

mais un ami avant tout.

à mes parents,

pour m'avoir toujours soutenu.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 26

I.1. Les communautés microbiennes dans l'environnement marin.....26

I.1.1. Définition, abondance et diversité des communautés microbiennes.....26

I.1.2. Les communautés microbiennes dans la colonne d'eau : l'ultraplancton.....29

I.1.2.1. Définition, diversité et distribution de l'ultraplancton.....29

I.1.2.2. Influence des variables environnementales naturelles sur les communautés ultraplanctoniques 33

I.1.2.3. Rôle de l'ultraplancton dans les écosystèmes marins.....36

I.1.3. Les communautés microbiennes associées à une surface : le biofilm 38

I.1.3.1. Définition des biofilms marins et conséquences économiques et écologiques liées au biofilm marin 38

I.1.3.2. Avantage du mode de vie en biofilm et rôle dans l'écosystème marin côtier.....41

I.1.3.3. Formation du biofilm microbien 42

I.1.3.4. Densité et diversité des microorganismes dans les biofilms marins.....44

I.1.3.5. Impact de l'environnement sur le biofilm microbien.....47

I.2. Les éléments traces métalliques dans les écosystèmes marins côtiers.....50

I.2.1. Nature et origines des éléments traces métalliques.....50

I.2.1.1. Notion d'élément trace métallique.....50

I.2.1.2. Origine et comportements des ETM dans les zones marines côtières.....51

I.2.2. Distribution des ETM dans les zones marines côtières.....54

I.2.2.1. Distribution des ETM dans la colonne d'eau 54

I.2.2.2. Les sédiments : puits et sources d'ETM.....55

I.2.3. Spéciation et biodisponibilité des ETM 56

I.2.3.1. Spéciation des ETM.....56

I.2.3.2. Biodisponibilité des ETM 57

I.3. Relations entre les éléments traces métalliques et les communautés microbiennes 59

I.3.1. Mécanismes de toxicité des ETMs 60

I.3.2. Mécanismes de résistance ou de tolérance : résister et s'adapter.....60

I.3.3. Effets des ETMs sur les communautés microbiennes en milieu marin côtier.....67

I.3.3.1. Principes fondamentaux d'écologie microbienne en lien avec une perturbation 67

I.3.3.2. Diversité, turnover et relations entre les espèces 69

I.3.3.3. Effets des ETMs sur les communautés microbiennes 73

I.4. Contexte géographique de l'étude : zone côtière méditerranéenne, la rade de Toulon 75

I.4.1. La Mer Méditerranée 75
I.4.2. La rade de Toulon....76
I.4.2.1. Caractéristiques géographiques, climatiques et hydrodynamiques 76
I.4.2.2. Contexte socio-économique et présentation des activités majeures dans la rade de Toulon .78
I.4.2.3. État des connaissances sur la contamination de la rade de Toulon....79
I.4.3. Programme de recherche....81

I.5. Objectifs de la thèse et organisation du manuscrit....83

CHAPITRE II. MATERIELS ET MÉTHODES 87

II.1. Présentation des sites de prélèvement, d'immersion et des systèmes expérimentaux 87
II.1.1. Sites de prélèvement et d'immersion 87
II.1.1.1. Suivi mensuel de la rade de Toulon : suivi DGT (Article I, Chapitre III)....91
II.1.1.2. Campagnes de terrain : mapping (Article 2, Chapitre III) 91
II.1.1.3. Immersion in situ (Projet PREVENT) (Articles 3 et 4, Chapitres IV et V) 91
II.1.2. Systèmes expérimentaux....92
II.1.2.1. Expériences en microcosmes (Article 1, Chapitre III) 92
II.1.2.2. Expériences en mésocosmes (Projet IMPRECI) (Article 5, Chapitre VI)....94

II.2. Les paramètres mesurés 96
II.2.1. Caractérisation physico-chimique des échantillons prélevés 97
II.2.1.1. Mesures *in situ* des caractéristiques physico-chimiques de l'eau....97
II.2.1.2. Analyses des concentrations en éléments traces métalliques....97
II.2.1.3. Analyses des concentrations en nutriments....98
II.2.2. Caractérisation des communautés microbiennes dans les échantillons prélevés 99
II.2.2.1. Détermination de la composition des communautés procaryotes (Articles 3, 4 et 5)....99
II.2.2.2. Estimation de la densité des communautés microbiennes dans les biofilms par qPCR (Article 4) 103
II.2.2.3. Estimation de l'abondance (Articles 1, 2, 3, et 5) et de la structure (Articles 1 et 2) des communautés ultraplanctoniques par cytométrie en flux 103

II.3. Traitements bioinformatiques et analyses statistiques 103
II.3.1. Traitements bioinformatiques des résultats de séquençage....104
II.3.1.1. Pipeline de QIIME (Articles 3 et 4) 104
II.3.1.2. Pipeline de DADA2 (Article 5) 105
II.3.2. Analyses statistiques des données de séquençage 108
II.3.2.1. Statistiques univariées 109
II.3.2.2. Statistiques multivariées 109

CHAPITRE III. INFLUENCE DE LA CONTAMINATION DES SÉDIMENTS ET DE L'EAU DE MER SUR L' ABONDANCE RELATIVE DES COMMUNAUTES ULTRAPLANCTONIQUES 112

III.1. Introduction du chapitre 112

III.2. Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area 114

III.2.1. Abstract 115

III.2.2. Introduction 116

III.2.3. Materials and methods 118

III.2.3.1. Study site 118

III.2.3.2. Sampling procedures for incubation experiments 119

III.2.3.3. Water incubation 120

III.2.3.4. Sediment elutriate incubation 121

III.2.3.5. Chemical analyses 122

III.2.3.6. Microbial community characterization 123

III.2.3.7. Statistical analysis 123

III.2.4. Results 124

III.2.4.1. Meteorological data and abiotic characterization of the surface seawater 124

III.2.4.2. Microbial community abundance and structure 127

III.2.4.3. Relationships between ultraphytoplankton community characteristics and environmental parameters 128

III.2.4.4. DOC, nutrient, and trace metal concentrations in incubation experiments 131

III.2.4.5. Ultraphytoplankton abundance dynamics in incubation experiments 134

III.2.5. Discussion 140

III.2.5.1. Chemical contamination of surface water in Toulon Bay 140

III.2.5.2. Relationships between ultraphytoplanktonic community and chemical gradients 142

III.2.5.3. Disentangling the drivers structuring the ultraphytoplanktonic community in Toulon Bay ... 146

III.2.5.4. Assessing the consequences of mixing chemically contrasted natural waters for the ultraphytoplankton community 148

III.2.6. Conclusion 149

III.3. Impact of sediment dredging on seawater quality: a long-term monitoring study of trace metals and microbial community in Toulon Bay (France) 151

III.3.1. Abstract 152

III.3.2. Introduction 153

III.3.3. Experimental 155

III.3.3.1. Study site 155

III.3.3.2. Sampling and samples pretreatment 156

III.3.3.3. Chemical analyses 157
III.3.3.4. Microbial community characterization 158
III.3.4. Results and discussion 159
III.3.4.1. Trace metal levels in the bay apart from the dredging activities period 159
III.3.4.2. Distribution and structure of ultraplancton apart from the dredging period 162
III.3.4.3. Trace metals spatial modification during dredging 165
III.3.4.4. Dredging accentuated the biological gradient of ultraplankton 167
III.3.5. Conclusion 168

III.4. Conclusion du chapitre 170

CHAPITRE IV. INFLUENCE DE LA MULTICONTAMINATION EN ETM DE L'EAU SUR L'ABONDANCE ET LA DIVERSITÉ TAXONOMIQUE DES COMMUNAUTÉS DE PROCARYOTES PLANCTONIQUES 172

IV.1. Introduction du chapitre 172

IV.2. Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area 174
IV.2.1. Abstract 175
IV.2.2. Introduction 176
IV.2.3. Materials and methods 178
IV.2.3.1. Study area and sample collection 178
IV.2.3.2. Bacterial community abundance by flow cytometry 179
IV.2.3.3. Bacterial community composition 180
IV.2.3.4. Data analysis 180
IV.2.4. Results 182
IV.2.4.1. General characteristics of Toulon Bay seawater samples 182
IV.2.4.2. Bacterial community dynamics 183
IV.2.4.3. Bacterial community composition (BCC) in relation with environmental variables 187
IV.2.4.4. Bacterioplankton predicted functional capabilities of microbial communities 190
IV.2.5. DISCUSSION 190
IV.2.5.1. Trace metal contaminations as drivers of bacterioplankton communities 191
IV.2.5.2. Implication regarding others local selective pressures 195
IV.2.5.3. Biotic interactions as evidences of indirect effects of trace metals 196
IV.2.6. Conclusion 198

IV.3. Conclusion du chapitre 199

CHAPITRE V. INFLUENCE DE LA MULTICONTAMINATION EN ETM DE L'EAU SUR LA DENSITÉ ET LA DIVERSITÉ GÉNÈTIQUE DES COMMUNAUTÉS DE PROCARYOTES DANS LES BIOFILMS..... 201

V.1. Introduction du chapitre 201

V.2. Evidence for microbial biofilm community structuring by sediment closeness rather than multichemical contamination or bacterioplankton composition.....203

V.2.1. Abstract 204

V.2.2. Introduction.....205

V.2.3. Experimental Procedures 207

V.2.3.1. Immersion sites, experimental design and sample collection 207

V.2.3.2. Environmental measurements.....209

V.2.3.3. DNA extraction, 16S rRNA gene amplicon sequencing and quantification.....209

V.2.3.4. Bioinformatic analysis 210

V.2.3.5. Data analysis.....210

V.2.4. Results 211

V.2.4.1. Physical and chemical environmental characterization of Toulon Bay seawater 211

V.2.4.2. Alpha diversity of prokaryotic fractions 212

V.2.4.3. Biofilm versus planktonic prokaryotic communities 213

V.2.4.4. Differences in biofilm communities between surface and bottom seawater of Toulon Bay..215

V.2.4.5. Differences in biofilm communities between sampling sites of Toulon Bay 219

V.2.4.6. Relationships between biofilm communities and environmental variables.....220

V.2.5. Discussion 220

V.2.5.1. Biofilm communities are dissimilar to planktonic communities 222

V.2.5.2. Influence of sediments on biofilm microbial communities 223

V.2.5.3. Limited impact of chemical contaminant gradient on microbial biofilm.....224

V.2.6. Conclusion 226

V.3. Conclusion du chapitre.....228

CHAPITRE VI. RÉPONSES SPÉCIFIQUES DES COMMUNAUTÉS DE PROCARYOTES À UNE CONTAMINATION MÉTALLIQUE REPRÉSENTATIVE DE LA RADE DE TOULON SELON LEUR PASSIF D'EXPOSITION 230

VI.1. Introduction du chapitre 230

VI.2. The specific impacts of copper and lead exposure on bacterioplankton communities originating from contaminated contrasted coastal seawaters: the influence of exposure history.....232

VI.2.1. Introduction 233
VI.2.2. Materials and methods 236
VI.2.2.1. Study area 236
VI.2.2.2. Seawater collection, processing, and storage 237
VI.2.2.3. Mesocosm setup, and experimental design 237
VI.2.2.4. Experimental time plan and sampling 239
VI.2.2.5. Seawater physico-chemical measurements and analyses 240
VI.2.2.6. Flow cytometry analysis 241
VI.2.2.7. DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of 16S rRNA gene amplicons 241
VI.2.2.8. Bioinformatic analysis 241
VI.2.2.9. Statistical analysis 242
VI.2.3. Results 243
VI.2.3.1. Physico-chemical characterization of seawater in mesocosms 243
VI.2.3.2. Ultraphytoplanktonic and heterotrophic prokaryotes abundance 244
VI.2.3.3. Prokaryotic alpha-diversity 246
VI.2.3.4. Prokaryotic community composition strongly shaped by Cu in contrast to Pb 249
VI.2.3.5. Influence of metal exposure history on copper effects 253
VI.2.4. Discussion 257
VI.2.4.1. Copper exposure induce changes in bacterioplankton communities 257
VI.2.4.2. Responses of bacterioplankton communities to Cu contamination according to their exposure history 259
VI.2.4.3. Limited effects of Pb contamination on bacterioplankton communities 261
VI.2.5. Conclusion 262

VI.3. Conclusion du chapitre 264

CHAPITRE VII. DISCUSSION GÉNÉRALE 266

VII.1. Rappel des objectifs et des approches utilisées 266

VII.2. Avantages et limites du couplage des analyses de cytométrie en flux et du séquençage haut débit 267

VII.2.1. Avantages de la cytométrie en flux 267
VII.2.2. Cas spécifique de la cytométrie en flux pour la mesure des densités cellulaires au sein des biofilms 269
VII.2.3. Limites de la cytométrie en flux 271
VII.2.4. Avantage du couplage de la cytométrie en flux avec le séquençage haut débit (métabarcoding) 271
VII.2.5. Limites du séquençage haut débit et approches futures 273

VII.3. Réponses des communautés microbiennes à une perturbation métallique selon le compartiment étudié : planctonique, biofilm et benthique.....274

VII.3.1. Abondance et diversité des communautés microbiennes le long du gradient métallique.....274

VII.3.2. Composition des communautés microbiennes en lien avec la contamination en ETMs.....277

VII.3.2.1. Les communautés ultraplanctoniques.....277

VII.3.2.2. Les communautés microbiennes dans les biofilms.....280

VII.3.2.3. Mise en relation des 3 compartiments.....281

VII.4. Importance d'autres facteurs biotiques et abiotiques sur la dynamique des communautés microbiennes.....283

VII.4.1. Importance du couplage bactérioplancton-ultraphytoplancton et des relations biotiques en général.....283

VII.4.2. Influence des conditions hydrodynamiques.....286

VII.4.3. Potentiels effets d'une contamination organique.....288

VII.5. *Synechococcus* : un groupe taxonomique représentatif des variations de contamination dans la rade de Toulon.....290

VII.5.1. Répartition spatiale de *Synechococcus* dans la rade de Toulon.....290

VII.5.2. Influences des ETMs sur le gradient d'abondance de *Synechococcus*.....291

VII.5.3. Utilisation de *Synechococcus* et des cyanobactéries comme bioindicateurs.....292

CHAPITRE VIII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....295

VIII.1. Conclusions générales de la thèse.....295

VIII.2. Perspectives.....297

VIII.2.1. Caractériser d'autres types de perturbation dans la rade de Toulon.....297

VIII.2.2. Améliorer l'étude de la diversité des communautés ultraplanctoniques.....297

VIII.2.3. Approfondir l'étude des communautés de biofilm de cette étude.....298

VIII.2.4. Prendre en compte le compartiment sédimentaire.....299

ANNEXE A. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 1.....300

ANNEXE B. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 2.....308

ANNEXE C. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 3.....309

ANNEXE D. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 4.....331

ANNEXE E. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 5 345

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 363

PRODUCTION SCIENTIFIQUE 413

TABLES DES ILLUSTRATIONS – FIGURES

CHAPITRE I

FIGURE I-1 L'ECHELLE DE TAILLE DE LA MATIERE ORGANIQUE (MO) ET DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS L'OCEAN. LA MO EST PRINCIPALEMENT DIVISEE EN DEUX : LA MATIERE ORGANIQUE PARTICULAIRE (MOP) ET LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE (MOD), SEPARATION BASEE SUR LA FILTRATION A 0.45 µM. CETTE LIMITE EST CONTESTEE ET CERTAINES ETUDES RECENTES PLACENT CE SEUIL A 0.2 µM. MODIFIE D'APRES AZAM AND MALFATTI, (2007). 27

FIGURE I-2 ILLUSTRATION SCHEMATIQUE ET NON EXHAUSTIVE DE LA PHYLOGENIE DES CLADES PROCARYOTES DOMINANTS. LES LETTRES NOIRES CORRESPONDENT AUX GROUPES BACTERIENS ET ARCHEENS UBIQUISTES DANS L'EAU DE MER. LES LETTRES EN OR CORRESPONDENT AUX GROUPES DOMINANTS DANS LA ZONE PHOTIQUE. LE BLEU CORRESPOND AUX GROUPES DOMINANTS DES ZONES MESOPELAGIQUES ET DE SURFACE DURANT L'HIVER POLAIRE. ENFIN LE VERT CORRESPOND AUX TAXA DOMINANTS DANS LES ECOSYSTEMES MARINS COTIERS. D'APRES GIOVANNONI AND STINGL (2005). 28

FIGURE I-3 DISTRIBUTION GLOBALE ACTUELLE DE L'ABONDANCE DE PROCHLOROCOCCUS (A) ET SYNECHOCOCCUS (B) A LA SURFACE DES OCEANS (FLOMBAUM *ET AL.*, 2013). 30

FIGURE I-4 REPARTITION GLOBALE DES COMMUNAUTES DE BACTERIOPLANCTON MARIN DES ZONES COTIERES (POMMIER *ET AL.*, 2007). 31

FIGURE I-5 STRUCTURATION MICROBIENNE DANS UN ECOSYSTEME MARIN. UNE GRANDE FRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE QUI EST SYNTHETISEE PAR LES PRODUCTEURS PRIMAIRES DEVIENT DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE (MOD) ET EST CAPTEE PAR LES BACTERIES. CES DERNIERES, EN ASSIMILANT LA MOD, EN MINERALISENT UNE PARTIE (~80%) EN CO2 ET EN SELS NUTRITIFS, ALORS QUE LA FRACTION RESTANTE (~20%) EST CONVERTIE EN BIOMASSE BACTERIENNE ET DEVIENT DISPONIBLE POUR LES ECHELONS TROPHIQUES SUPERIEURS. SELON AZAM AND MALFATTI (2007). 36

FIGURE I-6 SURFACES COLONISABLES PAR LES MICROORGANISMES DANS LES OCEANS (FLEMMING AND WUERTZ, 2019). 39

FIGURE I-7 BIOFOULING PRESENT SUR DIFFERENTES SURFACES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES. A : COQUE D'UN BATEAU (SOURCE : HTTPS://WWW.ALAMYIMAGES.FR/PHOTOS-IMAGES/HULL-FOULING.HTML); B : BOUTEILLE EN VERRE (SOURCE : HTTPS://WWW.ALAMY.COM/SEA-TRASH-IMAGE221779260.HTML); C : ROCHE (SOURCE : HTTP://JANEODW1.BLOGSPOT.COM); D : SEAU EN PLASTIQUE (SOURCE : HTTP://WWW.ANTHROPOCENEMAGAZINE.ORG/2017/10/AFIN-QUE-LES-CORAUX-MANGENT-MOINS-DE-PLASTIQUE-NOUS-DEVONS-LUI-DONNER-MAUVAIS-GOUT/?LANG=FR); ET E : COQUILLE DE CRABE (SOURCE : HTTP://IMAGES.4EVER.EU/ANIMAUX/SAUVAGES/CRABE-240937). 40

FIGURE I-8 PRINCIPALES ETAPES DE FORMATION D'UN BIOFILM MICROBIEN. MODIFIE D'APRES STOODLEY *ET AL.* (2002); HARAS (2005); MONROE (2007).ÉTAPE 1 : FORMATION DU FILM CONDITIONNANT ; ETAPE 2 : ADHESION BACTERIENNE REVERSIBLE ; ETAPE 3 : ADHESION BACTERIENNE IRREVERSIBLE ; ETAPE 4 : MATURATION ; ET ETAPE 5 : DETACHEMENT.....42

FIGURE I-9 DISTINCTION ENTRE LES COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES A UNE SURFACE ET CELLES DE L'EAU ENVIRONNANTE. A : PCOA BASEE SUR L'INDICE DE DISSIMILARITE BRAY-CURTIS CALCULE A PARTIR DE LA TABLE D'OTU DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES ECHANTILLONS DE PLASTIQUES, DE SEDIMENTS ET D'EAU DE MER (DE TENDER, DEVRIESE, *ET AL.*, 2017). B : DIAGRAMME DE VENN REPRESENTANT LE NOMBRE DE CLASSES PARTAGEES OU NON ENTRE LES ECHANTILLONS D'EAU DE MER ET DE BIOFILM (KIRSTEIN *ET AL.*, 2018). 46

FIGURE I-10 MODELE CONCEPTUEL REPRESENTANT (I) LES SOURCES ET LES PUITS DES ETM AINSI QUE (II) LES VARIABLES ET PROCESSUS PHYSIQUES, CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES REGISSANT LE COMPORTEMENT ET LA TOXICITE DES ETM EN MILIEU MARIN COTIER. D'APRES BIANCHI (2007) ET DE SOUZA MACHADO ET AL. (2016). 51

FIGURE I-11 SCHEMA DE LA SPECIATION DES ETMS, DES INTERACTIONS ENTRE LES DIFFERENTES FORMES CHIMIQUES ET DES INTERACTIONS ENTRE LES ETMS ET LES ORGANISMES VIVANTS. D'APRES BUFFLE AND CHALMERS (1988). 57

FIGURE I-12 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CONCEPT DE « BIOTIC LIGAND MODEL ». LE METAL LIBRE SOUS FORME IONIQUE (M^{2+}) PEUT INTERAGIR AVEC UN LIGAND BIOTIQUE (SITE D'ACTION). CETTE INTERACTION PEUT ETRE INFLUENCEE PAR PLUSIEURS FACTEURS DONT LA COMPETITION ET LA COMPLEXATION. DIFFERENTS CATIONS PEUVENT ENTRER EN COMPETITION AVEC LE METAL LIBRE SOUS FORME IONIQUE POUR SE FIXER AUX LIGANDS BIOTIQUES DES ORGANISMES. LA COMPETITION ENTRE LE CARBONE ORGANIQUE DISSOUS (COD) OU DES CATIONS NATURELLEMENT PRESENTS DANS L'ENVIRONNEMENT MARINS ET LES METAUX LIBRES POUR DES LIGANDS ORGANIQUES ET INORGANIQUES, RESPECTIVEMENT PEUVENT ENTRAINER UNE REDUCTION DE LA BIODISPONIBILITE DES IONS LIBRES. M : ELEMENT TRACE METALLIQUE. D'APRES DI TORO ET AL. (2001). 58

FIGURE I-13 COURBE DOSE-REPONSE EN FONCTION DU TEMPS. MBC : CONCENTRATION BACTERICIDE MINIMUM REPRESENTE CONVENTIONNELLEMENT LA CONCENTRATION D'UN AGENT ANTIMICROBIEN (ANTIBIOTIQUE, BIOCIDE OU METAL) QUI TUE AU MOINS 99,9% DE LA POPULATION BACTERIENNE ; MIC : CONCENTRATION INHIBITRICE MINIMALE REPRESENTE LA CONCENTRATION LA PLUS FAIBLE DE L'AGENT MICROBIEN QUI STOPPE LA CROISSANCE DE LA POPULATION BACTERIENNE. D'APRES HARRISON *ET AL.* (2007). 61

FIGURE I-14 LES MECANISMES DE RESISTANCE ET D'ADAPTATION AUX METAUX TOXIQUES PAR LES MICROORGANISMES (LEMIRE *ET AL.*, 2013). 62

FIGURE I-15 REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MODELE MULTIFACTORIEL DES MECANISMES DE RESISTANCE ET DE TOLERANCE DANS UN BIOFILM. D'APRES HARRISON *ET AL.* (2007). 66

FIGURE I-16 SCHEMA DES DIFFERENTS PROCESSUS ECOLOGIQUES FONDAMENTAUX REGISSANT LA COMPOSITION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES EN REPONSE A UNE PERTURBATION (ALLISON AND MARTINY, 2008). 68

FIGURE I-17 CARTE DE LA ZONE D'ETUDE : LA RADE DE TOULON. 77

FIGURE I-18 PRESENTATION DES QUATRE AXES DU PROJET PREVENT ET DES LABORATOIRES ASSOCIES. 82

CHAPITRE II

Figure II-1 Carte du site d'etude avec les stations de prelevement d'eau pour les campagnes de terrain (cercles, carres pleins et vides et triangles), le suivi mensuel (carres) et l'immersion (carres pleins et triangles), ainsi que la delimitation spatiale des activites anthropiques majeures dans la rade de Toulon. 88

Figure II-2 Microcosme installe en laboratoire dans une chambre de culture. 93

Figure II-3 Dispositif experimental en mesocosmes. A : Vue de devant du mesocosme ouvert. B : Vue arriere du mesocosme. C : Vue du mesocosme ouvert avec les bidons de 25 litres. D : Vue de devant du mesocosme ferme avec les 4 bidons d'alimentation de 50 litres. E : Vue ouverte du mesocosme avec les neons eclaires. F : Vue ouverte du mesocosme avec un zoom sur un bidon d'alimentation et un neon eclaire. 94

Figure II-4 Presentation des principales etapes de base du sequençage par la technique Illumina MiSeq. Source : https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models. 102

Figure II-5 Schema conceptuel du traitement des donnees de sequençage des amplicons du genes de l'ARNr 16S bacteriens avec QIIME 1.9. En vert : les donnees brutes du sequençage ; en jaune : les etapes de pretraitement des donnees ; en bleu : les etapes de traitements des donnees sous QIIME 1.9. Les analyses de diversite alpha et beta peuvent etre realisees avec d'autres logiciels que QIIME comme R par exemple. 105

Figure II-6 Description de l'approche DADA2. Les cercles representent des ensembles identiques de sequences de taille proportionnelle a l'abondance et la couleur correspond a la sequence sans erreur reelle (il existe 4 sequences differentes dans l'echantillon : rouge, bleu, vert et gris). Les erreurs sont introduites par le sequençage d'amplicons de la partie gauche vers la partie centrale du schema. Les methodes basees sur la formation d'OTUs regroupe les sequences similaires, faussement positive. DADA2 utilise un modele statistique d'erreurs d'amplicons pour deduire directement les ASVs a partir des sequences de l'echantillon. D'apres Callahan *et al.* (2016). 106

Figure II-7 Resultats de sequençage des amplicons du genes de l'ARNr 16S de differentes communautes microbiennes analyses avec les pipelines QIIME 1.9 et DADA2. Le sequençage a ete realise avec la technique de Illumina® MiSeq™ et a genere 93 762 sequences appariees (2 x 300 pb). L'analyse avec DADA2 n'a montre aucun faux positif alors que l'analyse sous QIIME a predit 9 faux positif. Lorsque la diversite de l'echantillon est elevee, la precision des deux analyses est similaire. En revanche, plus la diversite de l'echantillon est faible, plus l'analyse sous QIIME va generer des faux positifs. Source : https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/the-microbiomics-enlightenment. 107

Figure II-8 Schema conceptuel du traitement des donnees de sequençage des amplicons du genes de l'ARNr 16S bacteriens avec DADA2.En vert : les donnees brutes du sequençage ; en jaune : les etapes de traitement des donnees sous DADA2 ; en bleu : les analyses de diversite et les analyses statistiques complementaires. 108

CHAPITRE III

Figure III-1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites. Empty circles represent the 41 sites sampled for both surface seawater mappings and filled circles represent the 2 additional sites sampled for the surface seawater mapping of 2015. Triangles represent the 2 sites sampled for surface seawater (MIS and 41p) or surface sediment (MIS) for the incubation experiments. Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively. 119

Figure III-2 Abiotic parameters spatial variations in surface seawater of Toulon Bay in February 2015. A: Cu, B: Pb, C: N-NO3 −, D: P-PO43 −. Colour scales were drawn according to deciles of the respective datasets. For each parameter, the smallest and highest numbers of the colour scale represented the smallest and highest values measured, respectively. 126

Figure III-3 Spatial distributions of ultraphytoplanktonic groups in surface seawater of Toulon bay in February 2015, calculated from flow cytometry data. A: N-Eu,B: P-Eu,C: SYN, D: PRO. Values are expressed in cell mL^{-1}. Scales were drawn according to deciles of the respective datasets. 129

Figure III-4 Relationships between environmental variables, contaminants, nutrients and ultraphytoplanktonic communities for surface seawater samples in February 2015. RDA ordination describes the relationship between the environmental variables (pH, Salinity and Temperature), NO3 −, the chemical contaminants (Cu and Pb) and the ultraphytoplanktonic communities. Dotted circles gather similar samples (Confidence interval >0.95). Empty square: LaB, filled circle: LiB. 131

Figure III-5 Ultraphytoplankton abundance dynamics during the water incubation experiment. (A) Total abundance of ultraphytoplankton, (B) SYN, (C) N-Eu, (D) P-Eu and (E) PRO. Condition A represents uncontaminated control, B, trace metal addition, C, trace metals and nitrate addition, D, mixing uncontaminated with contaminated water and E, contaminated control. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively. 135

Figure III-6 Ultraphytoplankton abundance dynamics during the sediment elutriate incubation experiment. (A) Total abundance of ultraphytoplankton, (B) SYN, (C) N-Eu, (D) P-Eu and (E) PRO. F represents uncontaminated control, G, elutriate addition and H, metal addition. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively. 137

Figure III-7 Ultraphytoplankton community structure at the beginning and the end of both water and sediment elutriate incubation experiments. A represents uncontaminated control, B, trace metal addition, C, trace metals and nitrate addition, D, mixing uncontaminated with contaminated water and E, contaminated control for water incubation and F represents uncontaminated control, G, elutriate addition and H, metal addition for

ELUTRIATE INCUBATION. DIFFERENT LOWER-CASE LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCE BETWEEN COMPARED COMMUNITY STRUCTURES FOR EACH INCUBATION.....138

FIGURE III-8 HIERARCHICAL CLUSTERING OF ULTRAPHYTOPLANKTON COMMUNITIES OF INCUBATION AT THE BEGINNING ("START") AND THE END ("END") OF BOTH WATER (A) AND SEDIMENT ELUTRIATE (B) INCUBATIONS. A REPRESENTS UNCONTAMINATED CONTROL, B, TRACE METAL ADDITION, C, TRACE METALS AND NITRATE ADDITION, D, MIXING UNCONTAMINATED WITH CONTAMINATED WATER AND E, CONTAMINATED CONTROL FOR WATER INCUBATION AND F REPRESENTS UNCONTAMINATED CONTROL, G, ELUTRIATE ADDITION AND H, METAL ADDITION FOR ELUTRIATE INCUBATION SYN-LIKE (SYNECHOCOCCUS-LIKE) AND P-EU/N-EU (PICOEUKARYOTE-LIKE/NANOEUKARYOTE-LIKE) INDICATE THE DOMINANT GROUP(S) FOR EACH CONDITION AND DATE. SCALE INDICATES PERCENT DISSIMILARITY BASED ON BRAY-CURTIS DISTANCES MATRIX.....140

FIGURE III-9 LOCATION OF THE MONITORING SITES AND THE MAIN ANTHROPOGENIC ACTIVITIES IN TOULON BAY. CLOSED SQUARE: DREDGING SITE (DS), CLOSED TRIANGLE: INSIDE THE DUMPING SITE (IDUS) (INSIDE THE GEOTEXTILE BAG), CLOSED CIRCLE: OUTSIDE THE DUMPING SITE (ODUS) (OUTSIDE THE GEOTEXTILE BAG), OPEN TRIANGLE: REMOTE SITE (RS) (NEAR THE FISH FARMING AREA).....156

FIGURE III-10 SPATIAL VARIATIONS OF CU AND PB CONCENTRATIONS DURING THE TWO DEFINE PERIODS (APART FROM DREDGING AND DURING DREDGING). NO DATA WERE COLLECTED FOR PB DGT-LABILE FRACTION AT IDUS BECAUSE NO DGT COULD BE DEPLOYED AT THIS SITE. NOTE THAT CONCENTRATION SCALE IS GIVEN IN LOG-UNITS.....160

FIGURE III-11 SPATIAL VARIATIONS OF MICROBIAL GROUPS' ABUNDANCE DURING THE TWO DEFINE PERIODS (APART FROM DREDGING AND DURING DREDGING). SYN: SYNECHOCOCCUS-LIKE CELLS, PPE: PHOTOSYNTHETIC PICOEUKARYOTES-LIKE CELLS. 163

CHAPITRE IV

FIGURE IV-1 DYNAMICS OF DISSOLVED TRACE METALS CONCENTRATIONS IN SURFACE SEAWATER AT THE DIFFERENT SAMPLING STATIONS. SYMBOLS AND ERRORS BARS REPRESENT AVERAGE AND STANDARD DEVIATION, RESPECTIVELY. 179

FIGURE IV-2 SPATIAL VARIATIONS OF BACTERIOPLANKTON COMMUNITY STRUCTURE. (A) NON-METRIC DIMENSIONAL SCALING (NMDS) ORDINATION BASED ON BRAY–CURTIS DISSIMILARITY FOR 16S RRNA GENE LIBRARIES BETWEEN THE DIFFERENT SAMPLING SITES. EACH SYMBOL CORRESPONDS TO A DISTINCT SITE, TIME, AND DEPTH POINT. (B) BAR PLOT SHOWING THE AVERAGE FAMILY-LEVEL CONTRIBUTION FOR EACH SITE. FAMILIES THAT ON AVERAGE COMPRISED LESS THAN 1% OF THE LIBRARIES ARE GROUPED AS "OTHERS." COLORS INDICATE DIFFERENT CLASSES WITHIN PHYLA. 185

FIGURE IV-3 TAXONOMIC TREE GENERATED USING LEFSE ANALYSIS ($P < 0.05$, LDA EFFECT SIZE > 2) HIGHLIGHTING THE BIOMARKERS THAT STATISTICALLY DIFFERENTIATE SAMPLING SITES. NO BIOMARKER WAS EVIDENCED FOR THE SAMPLING SITE PT12. THE ROOTS OF CLADOGRAM STAND FOR THE DOMAIN (*I.E.* BACTERIA AND ARCHAEA), AND CONCENTRIC CIRCLES REPRESENT THE FOLLOWING TAXONOMIC LEVELS UNTIL THE TIPS STANDING FOR GENERA. 186

Figure IV-4 Contributions of environmental variables to spatial differentiation in bacterioplankton community structure. (A) Redundancy analysis (RDA) ordination diagram of the first two axes for bacterioplankton community composition. The percentage of the spatial variation in community structure explained by each axis is indicated in parentheses after the axis label. The constrained sets of environmental variables analyzed are indicated as vectors. NanoEuk: Nanoeukaryote abundance; PicoEuk: Picoeukaryotes abundance. (B) Venn diagram showing the variation partitioning (%) of the spatial variations in bacterioplankton community structure among four environmental datasets (Contaminants, Terrigenous elements, Marine tracers, and Nutrient and Biotic). 188

Figure IV-5 Co-occurrence subnetworks of bacterial taxa and environmental variables derived from the OTU table and showing only statistically significant correlations. Node size correspond to the relative abundance of the OTU. Nodes colors correspond to main bacterioplankton classes. Green and red lines represent positive and negative correlations, respectively. 189

Figure IV-6 Heatmap based on the main KEGG pathways predicted at the different sampling sites. Frequencies of predicted KEGG categories were normalized with reference to the uncontaminated site 41p. Enrichments correspond to the positive values and red colors, depletions correspond to negative values and blue colors. 191

CHAPITRE V

Figure V-1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites (A). Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively. Bottom and surface depths of sampling in each site (B) and immersion design at each site (C). 208

Figure V-2 Principal component analysis biplot of the environmental variables of surface and bottom seawater collected at the 5 different sites. Color of symbols depend on site sampling. 212

Figure V-3 Composition of heterotrophic microbial community at the family level in seawater (SW) and biofilm (BF) at surface (S) and bottom (B) samples at the 5 different sites of Toulon Bay. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. The dendrogram was conducted from the OTU abundance table using Bray-Curtis dissimilarity. The scale bar of the dendrogram represents the dissimilarity level (%) between heterotrophic community. 214

Figure V-4 Co-occurrence sub-networks using CONET analysis of bacterial taxa derived from the OTU table in surface (A) and bottom (B) samples and showing only statistically significant correlations. Nodes colors correspond to main bacterioplankton classes. Pie chart plots into nodes indicate OTU distribution between SW and BF samples. Green and red lines represent positive and negative correlations, respectively. 216

Figure V-5 Bubble plots showing the keystone OTUs from surface (A) and bottom (B) samples, each displaying a relative abundance in SW (blue) and biofilm (green) samples. 218

Figure V-6 Heatmaps showing Spearman correlations between surface (A) and bottom (B) biofilm keystone OTUs and the most discriminant environmental variables selected from PC analysis. The color intensity for each panel corresponds to spearman correlation, red indicates high levels of correlation while blue indicates low levels of correlation.....221

CHAPITRE VI

Figure VI-1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites. Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively 236

Figure VI-2 Layout of the experimental conditions (A) and experimental timeline (B) for the first mesocosm experiment. 238

Figure VI-3 Layout of the experimental conditions (A) and experimental timeline (B) for the second mesocosm experiment. 239

Figure VI-4 Total ultraphytoplankton (A) and total prokaryote (B) abundance (cell.mL^{-1}) dynamics during the first mesocosm experiment. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively. 245

Figure VI-5 Total ultraphytoplankton (A) and total prokaryote (B) abundance (cell.mL^{-1}) dynamics during the second mesocosm experiment. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively. 246

Figure VI-6 Composition of heterotrophic microbial community at the family level in 41p seawater and in the 4 conditions over the entire course of the first mesocosm experiment. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. Families that on average comprised less than 1% of the libraries are grouped as "Others." 248

Figure VI-7 Non-metric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray–Curtis dissimilarity for 16S rRNA gene libraries between the different conditions at different sampling times of the first mesocosm experiment. Each symbol corresponds to a distinct condition, time and replicate. Empty symbols represent initial seawater samples. 250

Figure VI-8 Relative abundance of genera found at week 5 (TF) of the first mesocosm experiment showing significant differences in abundance between conditions (SIMPER). Error bars represent the standard deviation (n = 3).

Specific contribution (%) of particular genera to total dissimilarity between prokaryotic communities of two conditions using SIMPER is detailed in Table E- 6. 252

Figure VI-9 Composition of heterotrophic microbial community at the family level in initial seawaters and in the 6 conditions over the entire course of both control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. Families that on average comprised less than 1% of the libraries are grouped as "Others." 254

Figure VI-10 Non-metric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray–Curtis dissimilarity for 16S rRNA gene libraries between the different conditions of both control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments. Each symbol corresponds to a distinct condition, time and replicate. Empty symbols represent initial seawater samples. 255

Figure VI-11 Relative abundance of genera found at week 5 (TF) in both control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments showing significant differences in abundance between conditions (SIMPER). Error bars represent the standard deviation (n = 3). Specific contribution (%) of particular genera to total dissimilarity between prokaryotic communities of two conditions using SIMPER is detailed in Table E- 9. 256

CHAPITRE VII

Figure VII-1 Relation entre le nombre de cellules ajoutees estimees par cytometrie en flux et le nombre de copies d'ADNr 18S mesurees par qPCR pour 3 taxa de picoeucaryotes (A) et relation entre la taille des cellulues (µM) et le nombre de copies de gene 18S dans une cellule en fonction des taxa (Zhu et al., 2005). 268

Figure VII-2 Cytogrammes d'un echantillon d'eau (A) et d'un echantillon de biofilm (B) obtenus par cytometrie en flux pour l'analyse d'une communaute autotrophe. P pourrait representer ici, des particules mises en suspension lors du protocole de separation des cellules et ne representerait alors pas des cellules du biofilm. La separation entre le groupe P et la population PicoEuk est difficile a delimiter du fait de ce groupe P. De façon generale, les populations sont bien moins individualisees lors de l'analyse des biofilms que lors de l'analyse d'echantillons d'eau. D'apres Zhao et al. (2012) et Camps et al. (2014). 270

Figure VII-3 Courbes Dose-reponse montrant la tolerance au Cu du groupe des procaryotes de 3 sites le long du gradient multiple de contamination en ETMs dans la rade de Toulon. De gauche a droite : 41p correspond au site tres peu contamine, LAZ au site intermediaire et 6ext au site tres contamine. 275

Figure VII-4 Abondance des groupes Synechococcus-like et picoeucaryotes photosynthetiques en surface de la colonne d'eau de rade de Toulon, determinee par cytometrie en flux (Chapitre III, article 1). 278

Figure VII-5 Reseau de co-occurrence base sur la communaute de bacterioplancton, la communaute ultraphytoplanctonique et les variables environnementales dans la rade de Toulon. Les ronds representent les taxa bacteriens, les carres gris representent les variables environnementales et les losanges gris representent l'abondance des 4 groupes ultraplanctoniques (3 groupes ultraphytoplanctoniques : SYN, pico- et nanoeucaryotes et un groupe procaryotes heterotrophes) determinee par cytometrie en flux (Chapitre IV, article 3). 285

Figure VII-6 Concentrations de la somme des 34 HAPs mesures (ng.L-1) dans l'eau durant une experience de remise en suspension de sediments de surface (0 – 2 cm) (a) et de sediments plus profonds (30 – 32 cm) (b). La ligne en pointilles represente la concentration dans l'eau de mer avant mise en contact avec les sediments (Guigue et al., 2017). 290

Figure VII-7 Structure des biofilms apres 1 mois d'immersion dans une eau moyennement contaminee LAZ (A et B) et une eau tres contaminee 6ext (C et D) sans ajout de Cu (A et C) ou avec un ajout de Cu pour atteindre 150nM, valeur haute pour la rade de Toulon (B et D). Jaune : cyanobacteries ; Vert : cellules eucaryotes autotrophes ; Rouge : cellules procaryotes heterotrophes. 294

TABLES DES ILLUSTRATIONS – TABLEAUX

CHAPITRE I

TABLEAU I-1 RESUME DES ETUDES DE TERRAIN OU EXPERIMENTALES ETUDIANT L'IMPACT D'UNE PERTURBATION METALLIQUE SUR DES COMMUNAUTES MICROBIENNES (BACTERIOPLANCTON ET BIOFILM AUTOTROPHE ET HETEROTROPHE) EN MILIEU MARIN COTIER ET UTILISANT DES TECHNIQUES D'ANALYSES MOLECULAIRES (N = 18). 72

CHAPITRE II

TABLEAU II-1 DESCRIPTION DES SITES DE PRELEVEMENT DANS LA RADE DE TOULON DURANT LES DIFFERENTES CAMPAGNES DE TERRAIN OU POUR LA MISE EN PLACE DES EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE. LE SUIVI DGT EST PRESENTE DANS L'**ARTICLE 1** (CHAPITRE III). LES 2 MAPPING ET LE MICROCOSME SONT PRESENTES DANS L'**ARTICLE 2** (CHAPITRE III). L'IMMERSION EST PRESENTEE DANS LES **ARTICLES 3 ET 4** (CHAPITRE IV ET V, RESPECTIVEMENT). LES MESOCOSMES 1 ET 2 SONT PRESENTES DANS L'**ARTICLE 5** (CHAPITRE VI). LES SITES EN GRAS REPRESENTENT LES SITES UTILISES POUR LES CAMPAGNES DE TERRAIN OU LES EXPERIMENTATIONS EN LABORATOIRE.....89

TABLEAU II-2 RECAPITULATIF DES DIFFERENTS JEUX DE DONNEES SEQUENCES, DES PREPARATIONS POUR L'ENVOI AU SEQUENÇAGE ET DES DIFFERENTS PRESTATAIRES DE SEQUENÇAGE. 100

CHAPITRE III

TABLEAU III-1 CONCENTRATION OF CHEMICAL CHARACTERISTICS FOR SAMPLING SEAWATER AND AVERAGE CONCENTRATION BETWEEN THE BEGINNING AND THE END OF BOTH WATER MIXING INCUBATION AND SEDIMENT ELUTRIATE INCUBATION FOR EACH CONDITION. 133

TABLEAU III-2 RANGES AND AVERAGE VALUES OF DISSOLVED AND TOTAL CU AND PB CONCENTRATIONS (IN NM) AT THE THREE SITES MONITORED APART FROM THE DREDGING PERIOD.....159

TABLEAU III-3 THE RANGES AND AVERAGE VALUES OF DISSOLVED AND TOTAL CU AND PB CONCENTRATIONS (IN NM) AT THE FOUR SITES MONITORED DURING THE DREDGING PERIOD. VALUES IN PARENTHESES CORRESPONDS TO PERCENTAGE AND ABSOLUTE (IN NM) INCREASE IN CONCENTRATIONS COMPARED TO NON-DREDGING PERIOD. 165

CHAPITRE V

TABLEAU V-1 RESULTS OF LINEAR DISCRIMINANT ANALYSIS TEST TO IDENTIFY DIFFERENTIALLY ABUNDANT OTUS FOR SAMPLING DEPTH COMPARISONS USING LEFSE (LOG LDA SCORE > 2; P < 0.05).....217

CHAPITRE VI

TABLEAU VI-1 TWO-WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA) FOR ALPHA DIVERSITY INDEXES OF SEAWATER ACROSS DIFFERENT CONDITIONS AND SAMPLING TIMES FOR THE FIRST (A) AND THE SECOND (B) MESOCOSM EXPERIMENT. 247

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les communautés microbiennes dans l'environnement marin

Dans cette première partie, un volet initial sera consacré à la présentation des communautés microbiennes marines. Le second et le troisième volet seront ensuite dédiés aux communautés ultraplanctoniques d'une part et à celles des biofilms d'autre part avec une revue détaillée de leur diversité, de leur distribution ainsi que de leur rôle écologique dans l'environnement marin.

I.1.1. Définition, abondance et diversité des communautés microbiennes

Les communautés microbiennes marines sont composées de procaryotes, d'eucaryotes unicellulaires, et de fungi. Ces organismes incluent principalement des producteurs primaires phototrophes et des producteurs secondaires hétérotrophes. Les communautés microbiennes sont impliquées dans la boucle microbienne, qui consiste à la production de matière organique dissoute (MOD) par des producteurs primaires phototrophes, à l'utilisation de la MOD par les producteurs primaires hétérotrophes et à la consommation des producteurs primaires par les producteurs secondaires hétérotrophes (Azam *et al.*, 1983). Le matériel et l'énergie consommés par les producteurs secondaires peut ensuite être transféré vers des macroorganismes ou sédimenter vers le fond des océans. Toutefois, une grande partie du carbone organique est utilisé par les organismes hétérotrophes sous forme de dioxyde de carbone (CO_2) tandis que d'autres composants organiques sont minéralisés pour devenir des nutriments inorganiques essentiels tels que l'ammonium et le phosphate. D'une manière générale, les communautés microbiennes sont responsables de plus de 50% de la production primaire des océans (Azam and Malfatti, 2007; Kirchman *et al.*, 2009) et jouent un rôle crucial dans le contrôle des flux biogéochimiques des éléments essentiels tels que le carbone, l'azote, le phosphate et le fer (Falkowski *et al.*, 2008; Robinson, 2008; Kirchman *et al.*, 2009). Dans le cadre de cette thèse, les organismes procaryotes chimiolitho- et chimioorgano-hétérotrophes (par la suite ils seront simplement qualifiés de procaryotes hétérotrophes) (bactéries et archées) et photolitho et photoorgano-autotrophes (par la suite ils seront simplement qualifiés de procaryotes autotrophes) (cyanobactéries, bactéries sulfureuses pourpres et

vertes) et les organismes eucaryotes autotrophes qui correspondent au picophytoplancton (0.2-2 µm) et au nanophytoplancton (2-20 µm) (Figure I-1) ont été considérés. Les procaryotes autotrophes autres que les cyanobactéries (bactéries sulfureuses pourpres et vertes) sont très peu représentés dans les milieux marins côtiers (Sieradzki *et al.*, 2018) et n'ont pas fait l'objet d'une étude approfondie.

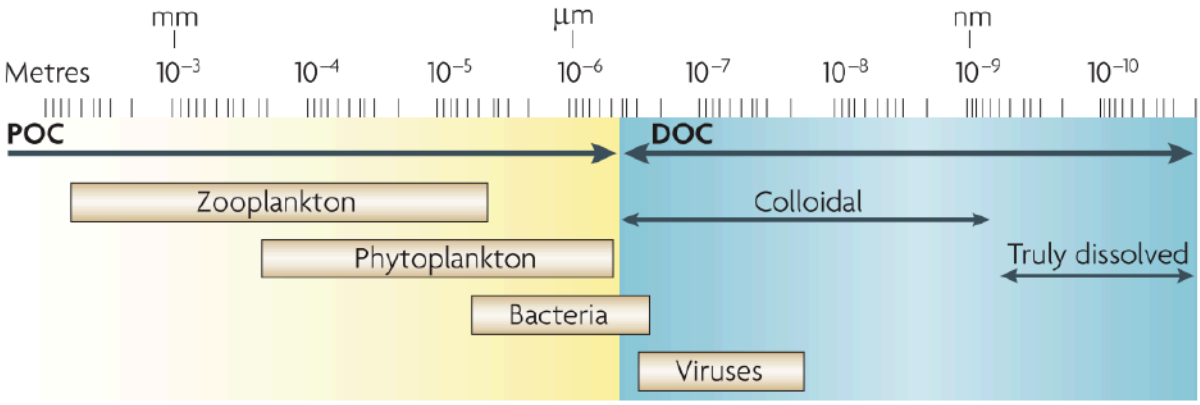


Figure I-1 L'échelle de taille de la matière organique (MO) et des communautés microbiennes dans l'océan. La MO est principalement divisée en deux : la matière organique particulaire (MOP) et la matière organique dissoute (MOD), séparation basée sur la filtration à 0.45 µm. Cette limite est contestée et certaines études récentes placent ce seuil à 0.2 µm. Modifié d'après Azam and Malfatti, (2007).

Selon Whitman *et al.* (1998), le nombre d'organismes unicellulaires dans l'océan dépasse 10^{29} cellules, avec une concentration moyenne de 10^{6} cellules par millilitre d'eau de mer. En 2010, les études basées sur de la culture d'organismes avaient décrit plus de 10 000 espèces bactériennes et archéennes et estimé à 200 000 le nombre d'espèces eucaryotes unicellulaires (Macintyre *et al.*, 2010). Les nouvelles méthodes de séquençage des gènes de l'ARN ribosomique 16S ou 18S ont permis de recenser 100 fois plus d'espèces (Sunagawa *et al.*, 2015; Salazar and Sunagawa, 2017) que par les méthodes de culture (Pace, 1997). La première étude visant à évaluer la diversité bactérienne marine en utilisant les outils moléculaires a été menée par Giovannoni *et al.* (1990) dans la mer des Sargasses et a révélé une diversité méconnue de groupes bactériens dominants. Par la suite, plusieurs clades non cultivables et abondants dans les océans ont été identifiés, comme les SAR par exemple, isolés lors d'analyses génétiques dans la Mer des Sargasses (Giovannoni *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2002). L'arrivée du séquençage de nouvelle génération (NGS pour « Next Generation

Sequencing ») dans les années 2000 a fortement augmenté la résolution des analyses de diversité. Ainsi, l'arbre phylogénétique des microorganismes regroupe actuellement un grand nombre de phyla (Thomas *et al.*, 2016), une diversité importante dans les phyla mais aussi une différence de diversité forte entre les phyla. L'arbre phylogénétique continue de s'enrichir avec la découverte constante et croissante de nouvelles espèces dans tous les compartiments marins (*i.e.* planctonique, benthique et biofilm) (Figure I-2).

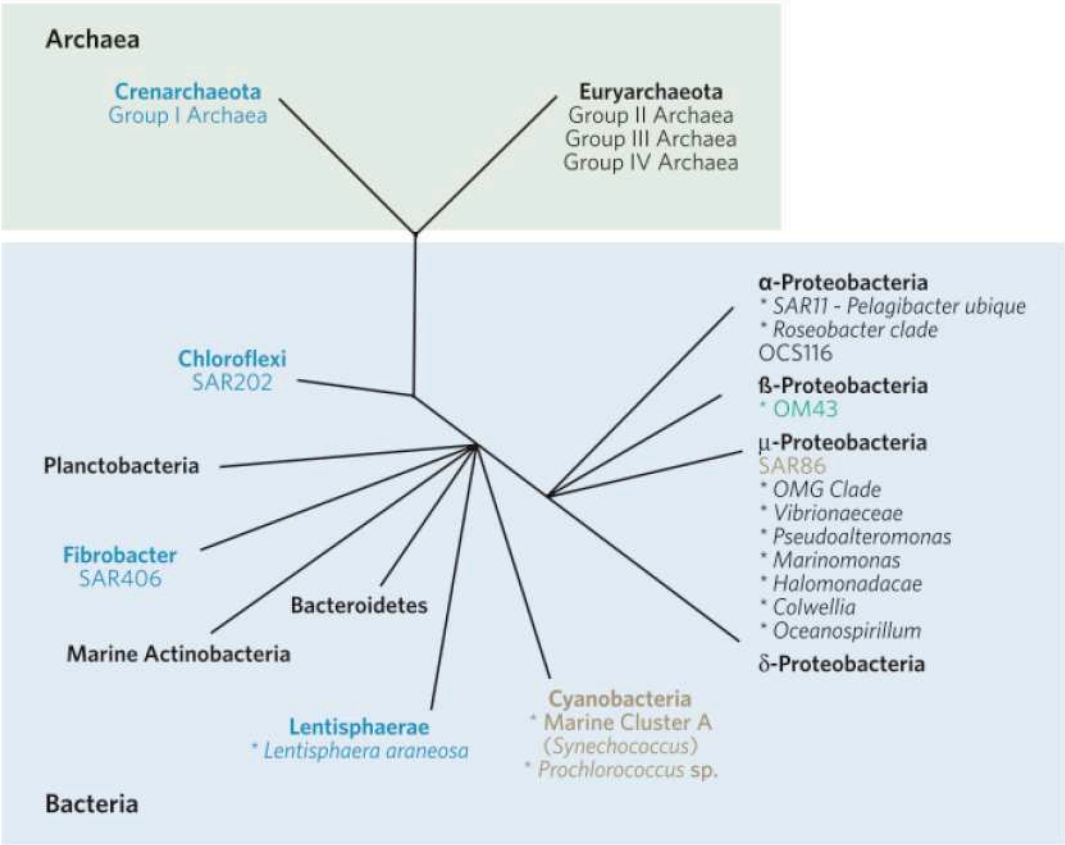


Figure I-2 Illustration schématique et non exhaustive de la phylogénie des clades procaryotes dominants. Les lettres noires correspondent aux groupes bactériens et archéens ubiquistes dans l'eau de mer. Les lettres en or correspondent aux groupes dominants dans la zone photique. Le bleu correspond aux groupes dominants des zones mesopélagiques et de surface durant l'hiver polaire. Enfin le vert correspond aux taxa dominants dans les écosystèmes marins côtiers. D'après Giovannoni and Stingl (2005).

I.1.2. Les communautés microbiennes dans la colonne d'eau : l'ultraplancton

I.1.2.1. Définition, diversité et distribution de l'ultraplancton

L'ultraplancton correspond à tous les organismes planctoniques compris entre 0.2 et 20 µm. Il se compose d'organismes procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées), de procaryotes autotrophes (cyanobactéries), d'organismes eucaryotes autotrophes (pico- et nanophytoplancton) et d'eucaryotes hétérotrophes (pico- et nanoflagellés, ciliés et quelques amibes) (Sieburth *et al.*, 1978; Mostajir *et al.*, 2013). Au cours de cette thèse, les organismes procaryotes (bactéries, archées et cyanobactéries) appelés bactérioplancton et une partie des organismes eucaryotes autotrophes (< 20 µm, c'est-à-dire pico- et nanophytoplancton) appelée ultraphytoplancton ont été considérés.

Le domaine des bactéries est cosmopolite, ubiquiste et composé d'organismes hétérotrophes et autotrophes affiliés à 96 phyla (Thomas *et al.*, 2016). La richesse totale des océans est estimée entre 35550 et 44500 espèces (Zinger *et al.*, 2011; Sunagawa *et al.*, 2015). La richesse des espèces augmente généralement des pôles vers l'équateur (Pommier *et al.*, 2007; Ghiglione *et al.*, 2012). La densité des bactéries hétérotrophes des milieux océaniques varie entre 10^4 cellules par millilitre dans les eaux très oligotrophes et 10^6 cellules par millilitre dans les milieux plus eutrophes (Sunagawa *et al.*, 2015). L'abondance des cyanobactéries dans les milieux marins est très variable mais est généralement d'environ 10^4 cellules par millilitre, avec une abondance plus importante dans les milieux marins côtiers. Les cyanobactéries sont présentes de la surface jusqu'à environ 150 mètres dans les océans oligotrophes, entre 40°N et 40°S (Figure I-3). Les populations de cyanobactéries décroissent de l'équateur vers les zones polaires où les températures sont inférieures à 15°C (Flombaum *et al.*, 2013). Les membres du phylum Proteobacteria, incluant les différents clades de SAR11 (Alphaproteobacteria) et SAR86 (Gammaproteobacteria) sont considérés comme les groupes les plus abondants et diversifiés des différents océans du globe (Sunagawa *et al.*, 2015). Comme dans les eaux océaniques oligotrophes, les membres de la classe Alphaproteobacteria, notamment SAR11, et Gammaproteobacteria sont les plus abondants dans les eaux côtières, suivis des Bacteroidetes, des Actinobacteria, des Verrucomicrobia et des cyanobactéries (Figure I-4) (Pommier *et al.*, 2007; Zinger *et al.*, 2011). Parmi les cyanobactéries, *Synechococcus* et *Prochlorococcus* sont les genres les plus abondants et les plus diversifiés, avec de nombreux groupes phylogénétiques dans les océans (Scanlan and West, 2002; Garcia-Pichel *et al.*, 2003;

Mella-Flores *et al.*, 2011; Flombaum *et al.*, 2013; Sohm *et al.*, 2015; Engh *et al.*, 2017). Pour *Prochlorococcus*, plusieurs écotypes peuvent coexister dans la colonne d'eau : les « hight light-adapted » (HLI et HLII), « High nutrient low chlorophyll » (HNLC1 et HNLC2), les « low light-adapted » (LLI, LLII et LLIV). Pour *Synechococcus*, 10 clades ont été définis (clade I à X) (Fuller *et al.*, 2003). Synechococcus préfère les eaux claires, riches en nutriments et peut créer des blooms printaniers lors de mélanges de masses d'eau (Mella-Flores *et al.*, 2011). *Prochlorococcus* est plus abondant dans les eaux oligotrophes et sa densité est maximale en été et en automne quand les eaux sont stratifiées (Mella-Flores *et al.*, 2011).

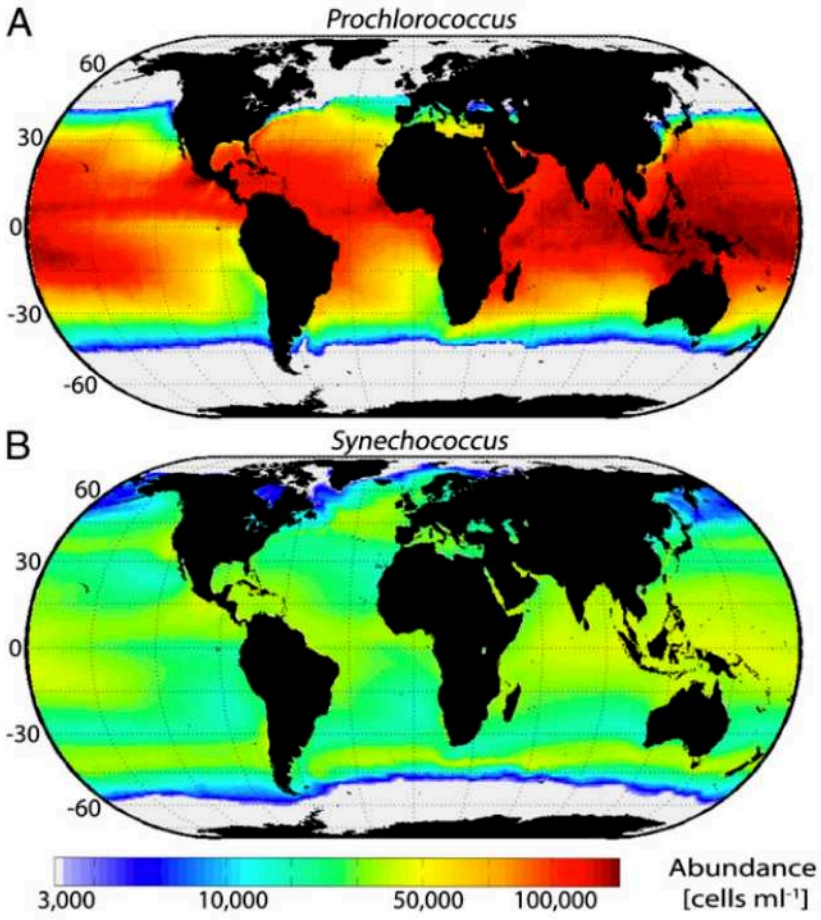


Figure I-3 Distribution globale actuelle de l'abondance de Prochlorococcus (A) et Synechococcus (B) à la surface des océans (Flombaum *et al.*, 2013).

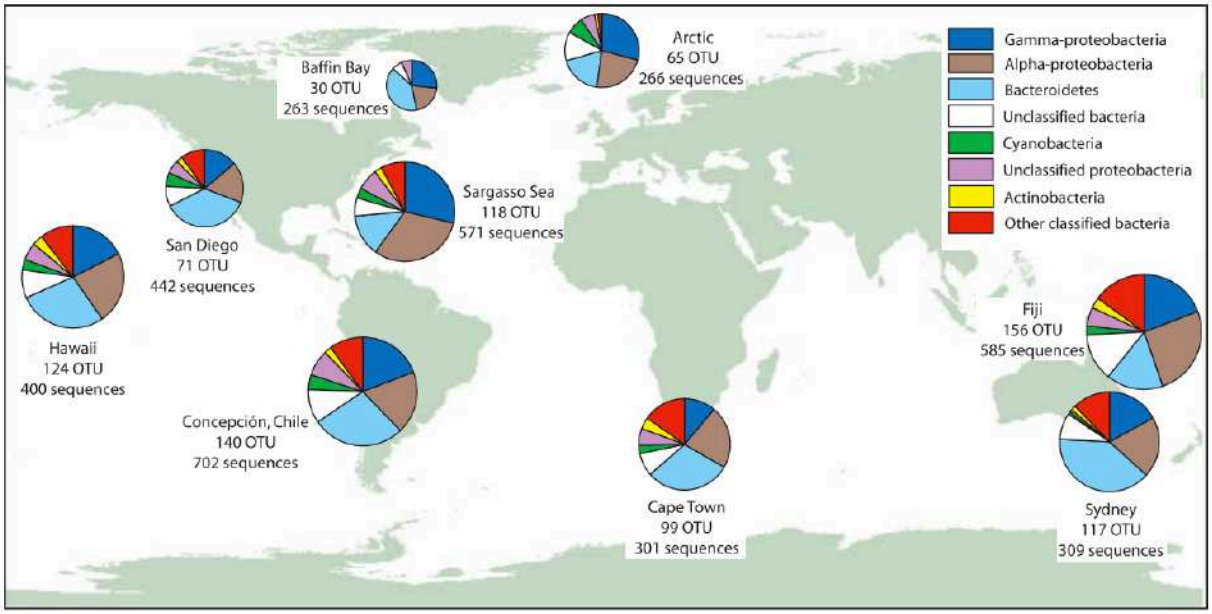


Figure I-4 Répartition globale des communautés de bactérioplancton marin des zones côtières (Pommier *et al.*, 2007).

Les archées constituent un groupe ubiquiste et abondant parmi le bacterioplancton (Delong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992). Elles ont longtemps été associées aux milieux extrêmes en termes de température, de pression, de disponibilité en oxygène, de pH ou de salinité, néanmoins elles font partie des organismes les plus abondants dans les océans (Fuhrman and Steele, 2008; Parada and Fuhrman, 2017; Lambert *et al.*, 2018; Santoro *et al.*, 2018). Il existe 4 groupes d'archées marines planctoniques : Marine Group I (MGI) (Thaumarchaeota) (Delong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992), MGII (Euryarchaeota et Thalassoarchaea) (Massana *et al.*, 2000), MGIII (Pontarchaea) et MGIV (López-García *et al.*, 2001). Ces 4 groupes diffèrent fortement dans leur distribution et leur abondance totale dans la colonne d'eau (Delong *et al.*, 2006). Les Thaumarchaeota sont retrouvés de l'équateur jusqu'aux pôles, des eaux de surface aux profondeurs de la colonne d'eau (Santoro *et al.*, 2018), avec une abondance maximale dans les zones mesopélagiques. L'abondance des MGI varie dans le temps, particulièrement dans les eaux côtières où ils peuvent occasionnellement former des blooms (Hollibaugh *et al.*, 2011). Des abondances élevées de MGI ont été retrouvées en hiver dans la baie de Blanes (Espagne) dans le nord de la Mer Méditerranée (Galand *et al.*, 2010). Comme les MGI, les archées MGII sont retrouvées dans tous les océans de la planète, avec une abondance maximale dans la zone euphotique des océans tropicaux (Delong *et al.*, 2006). Les

variations temporelles de MGII sont très importantes et ces archées sont généralement couplées aux blooms phytoplanctoniques (Galand *et al.*, 2010), composant parfois jusqu'à 30% de l'abondance bactérioplanctonique totale (Needham and Fuhrman, 2016). Les archées MGIII et MGIV sont très peu décrites, ainsi peu d'informations sur leur distribution et la variation temporelle de ces groupes sont disponibles. Si le rôle des archées au sein des écosystèmes est pour l'heure encore mal connu, elles contribuent toutefois aux cycles de l'azote et du carbone (Santoro *et al.*, 2018).

L'ultraphytoplancton est composé de tous les organismes unicellulaires autotrophes planctoniques de taille inférieure à 20 µm (Sieburth *et al.*, 1978). L'ultraphytoplancton est notamment composé de procaryotes autotrophes (cyanobactéries) décrits précédemment (Scanlan and West, 2002; Garczarek *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2009; Mella-Flores *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2015; Sohm *et al.*, 2015) mais aussi d'eucaryotes autotrophes unicellulaires, appelés pico- et nanoeucaryotes photosynthétiques. Le pico- et le nanophytoplancton sont distribués très largement dans tous les océans (Li *et al.*, 1984). L'abondance du pico- et du nanophytoplancton fluctue entre 10^3 et 10^6 cellules par millilitre selon le milieu et est généralement maximale en période printanière, en raison de l'élévation de l'ensoleillement, de la température et de la disponibilité en nutriments. Ces deux groupes représentent 50 à 90% de la biomasse phytoplanctonique totale des milieux oligotrophes et contribuent activement à la production primaire (Platt *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1984). Toutefois, de manière générale, la diversité taxonomique du picophytoplancton est plus élevée que chez le nanophytoplancton (de Vargas *et al.*, 2015). Dans la zone photique des océans, les principaux groupes pico- et nanophytoplanctoniques sont les Photodinophyceae, les Dictyochophyceae, les Bacillariophyta, les Haptophyta et les Cryptophyta (de Vargas *et al.*, 2015). Dans les zones côtières en notamment en Méditerranée, les Chlorophyceae, Prasinophyceae, Prymnesiophycea sont des groupes importants de pico- et nanophytoplancton (Grégori *et al.*, 2001).

La présentation et la description générale des groupes ultraplanctoniques à l'échelle globale est un premier pas vers la compréhension de l'écologie de ces microorganismes. Toutefois ces groupes sont soumis à des variations environnementales, à la fois temporelles et spatiales qui vont influencer leur distribution dans les différentes zones des océans. Deux visions s'opposent quant à la distribution des microorganismes ; l'une décrit les microorganismes planctoniques comme cosmopolites (Fenchel and Finlay, 2004), l'autre

propose que les microorganismes ont une répartition géographique limitée, influencée par les conditions environnementales (Thane Papke and Ward, 2004; Telford *et al.*, 2006). Un des enjeux majeurs en écologie microbienne est alors de comprendre les facteurs qui affectent la dynamique temporelle et la distribution spatiale des microorganismes, et d'identifier les processus qui causent ces différences d'abondance, de structure et de composition au sein des communautés microbiennes.

I.1.2.2. Influence des variables environnementales naturelles sur les communautés ultraplanctoniques

L'un des arguments principaux derrière l'hypothèse « Everything is everywhere » (pour « Tout est partout ») est que la capacité de dispersion des microorganismes et par conséquent leur potentiel de colonisation d'une nouvelle zone géographique sont tellement grands qu'ils empêchent la différenciation spatiale des communautés microbiennes (Fenchel and Finlay, 2004). L'idée que tout est partout est toutefois contredite par de nombreuses études montrant que l'abondance et la composition des communautés ultraplanctoniques diffèrent selon la zone géographique ou la période temporelle et que ces différences peuvent être corrélées avec les facteurs environnementaux (Giovannoni and Stingl, 2005; Martiny *et al.*, 2006; Pommier *et al.*, 2007; Zinger *et al.*, 2011). Ainsi, en accord avec l'hypothèse de Baas-Becking et Beijerinck « Everything is everywhere, but the environment selects » (pour « Tout est partout, mais l'environnement sélectionne »), la dispersion des microorganismes, les variations spatio-temporelles des facteurs environnementaux et les interactions entre microorganismes sont responsables des variations de distribution des populations microbiennes dans les océans (de Wit and Bouvier, 2006).

La répartition verticale des facteurs physico-chimiques le long de la colonne d'eau, de la surface vers le fond des océans comme la diminution de la pénétration de la lumière, de la température et de la disponibilité en MOD ont été identifiés comme des facteurs importants qui déterminent la stratification des communautés microbiennes (Field *et al.*, 1997; Giovannoni and Stingl, 2005; Delong *et al.*, 2006). Ainsi, l'ultraphytoplancton qui apparait particulièrement sensible à la disponibilité en lumière et à la disponibilité en nutriments le long de la colonne d'eau disparait avec la profondeur (Schallenberg and Burns, 2004; Delong *et al.*, 2006; Zinger *et al.*, 2011; Thyssen *et al.*, 2014; Bonato *et al.*, 2016; Goes *et al.*, 2016).

Dans les abysses, la zonation verticale des procaryotes peut être expliquée en partie par les capacités de certains groupes, archéens notamment, à se développer sous des conditions de pression hydrostatique très importantes (Yayanos, 1995; Fuhrman and Davis, 1997). D'autres études ont montré l'existence d'une répartition géographique fortement liée au type d'habitat et au climat (Giovannoni and Stingl, 2005; Pommier *et al.*, 2007; Biers *et al.*, 2009; Barberán and Casamayor, 2010; Ghiglione *et al.*, 2012). A l'échelle globale des océans, la température est apparue comme un facteur essentiel de structuration des communautés microbiennes, conduisant à une répartition très différente en fonction de la latitude (Ghiglione *et al.*, 2012; de Vargas *et al.*, 2015; Sunagawa *et al.*, 2015).

Dans les environnements côtiers, les communautés microbiennes sont d'autant plus liées aux facteurs environnementaux que les gradients sont forts, à une échelle spatiale relativement réduite. Typiquement, les eaux côtières sont bien plus productives que les eaux du large car les phénomènes d'upwelling, de mélange des masses d'eau et de ruissellement des eaux du continent vers les eaux marines favorisent l'apport de nutriments vers la surface (Giovannoni and Stingl, 2005). Une augmentation locale de la disponibilité en nutriments peut ainsi favoriser certains organismes procaryotes hétérotrophes, comme les Flavobacteria qui exercent une pression de compétition très efficace sur les autres groupes de bacterioplancton (Goericke, 2002; Biers *et al.*, 2009). Les différences de communautés microbiennes entre l'océan ouvert et les zones côtières peuvent être le résultat d'influence d'eau douce venue des cours d'eau et du ruissellement de l'eau de pluies. Cet apport d'eau douce dans le milieu marin peut modifier la salinité de la colonne d'eau et créer des gradients de salinité importants, pouvant affecter la composition des communautés de bactérioplancton (Bouvier and del Giorgio, 2002; Crump *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2004; Schapira *et al.*, 2010; Logares *et al.*, 2013). L'apport de particules terrigènes et de sédiments environnants, notamment dans les eaux côtières peu profondes, peuvent entrainer des changements de composition des communautés dans la colonne d'eau par la remise en suspension de microorganismes benthiques et par la modification de la qualité de l'eau et de la disponibilité en nutriments (Rappé *et al.*, 2000; Zinger *et al.*, 2011).

Outre la répartition spatiale des communautés ultraplanctoniques liées aux variations verticales et horizontales des facteurs environnementaux, l'abondance et la composition de ces communautés peuvent également être fortement corrélées aux variations temporelles des caractéristiques environnementales du milieu marin. L'étude des variations saisonnières

des communautés microbiennes des océans a été rendue possible par l'utilisation de séries temporelles longues (Fuhrman and Steele, 2008; Treusch *et al.*, 2012; Vergin *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015; Taylor and Cunliffe, 2016; Engh *et al.*, 2017; Ward *et al.*, 2017; Martin-Platero *et al.*, 2018) Les variations saisonnières d'abondance, de structure voire de fonction des communautés de procaryotes hétérotrophes sont généralement liées à la stratification des masses d'eau en milieu océanique, à la qualité et la quantité des ressources nutritives, à la température de l'eau, et à la durée du jour (Morris *et al.*, 2002; Fuhrman *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2009; Gilbert *et al.*, 2009, 2012; Treusch *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2013; Vergin *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015). Les études à long-terme, pluriannuelles, ont montré le caractère répétitif des modèles saisonniers de ces communautés (Fuhrman *et al.*, 2006; Galand *et al.*, 2010). Une des raisons de cette répétabilité interannuelle peut être le couplage étroit entre les communautés de bactérioplancton et les communautés phytoplanctoniques, les variations de l'un de ces compartiments pouvant fortement influencer l'autre (Morán *et al.*, 2002; Pinhassi *et al.*, 2004; Baltar *et al.*, 2015; Lambert *et al.*, 2018). Des études récentes ont démontré la rapide succession des communautés de bactérioplancton en réponse à des phénomènes de forte mortalité juste après un bloom phytoplanctonique (Teeling *et al.*, 2012; El-Swais *et al.*, 2015; Luria *et al.*, 2017). Le cycle annuel des communautés phytoplanctoniques est, comme celui du bactérioplancton, contrôlé par les variations saisonnières des conditions physico-chimiques du milieu (Treusch *et al.*, 2012; El-Swais *et al.*, 2015; Needham and Fuhrman, 2016). Les blooms phytoplanctoniques sont généralement contrôlés par l'augmentation de la disponibilité en nutriments et en lumière, en plus d'une stratification partielle des masses d'eau, conduisant à une croissance des microorganismes phytoplanctoniques supérieure au broutage, aux infections virales et à d'autres pertes. Ce bilan positif de croissance résulte en une accumulation de biomasse et donc en un bloom phytoplanctonique (Buchan *et al.*, 2014; Needham and Fuhrman, 2016).

Étant donné le fait que les écosystèmes côtiers sont sujets à d'importantes contaminations de nature très variable, dues à l'augmentation des activités anthropiques (Halpern *et al.*, 2008), une attention toute particulière devra être donnée sur l'étude des variations de la distribution des communautés microbiennes le long de gradients anthropiques dans les zones marines côtières.

I.1.2.3. Rôle de l'ultraplancton dans les écosystèmes marins

Il est aujourd'hui bien établi que les communautés microbiennes marines ont un rôle crucial dans le cycle du carbone, la reminéralisation du carbone via la respiration et le transfert du carbone organique issu du phytoplancton vers les niveaux trophiques plus élevés (Azam *et al.*, 1983; Whitman *et al.*, 1998; Azam and Malfatti, 2007). Historiquement, les océanographes pensaient que la majorité de la production primaire passait à travers une chaîne linéaire, des petits organismes vers les grands animaux (Pomeroy, 1974), les microorganismes étant largement ignorés. Cependant, certaines découvertes majeures faites durant ces 40 dernières années ont montré que les bactéries dominaient l'abondance, la diversité et l'activité métabolique des océans (Hobbie *et al.*, 1977; Hagstrom *et al.*, 1979; Fuhrman and Azam, 1980). Azam *et al.* (1983) développent alors le concept de boucle microbienne qui remet en cause le schéma classique du réseau trophique linéaire et met les bactéries au centre des cycles biogéochimiques dans les océans (Figure I-5).

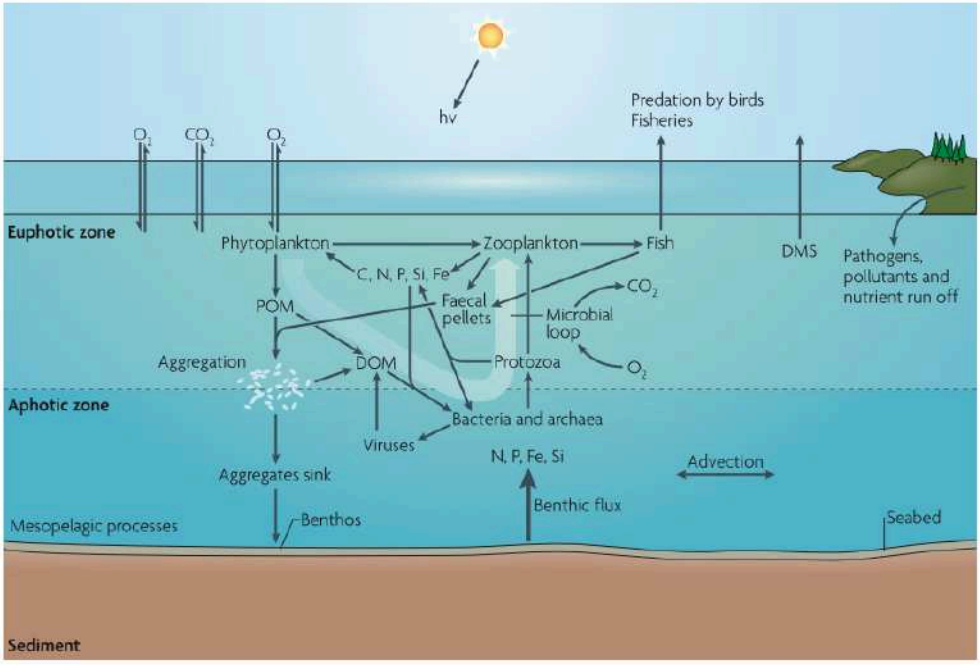


Figure I-5 Structuration microbienne dans un écosystème marin. Une grande fraction de la matière organique qui est synthétisée par les producteurs primaires devient de la matière organique dissoute (MOD) et est captée par les bactéries. Ces dernières, en assimilant la MOD, en minéralisent une partie (~80%) en CO2 et en sels nutritifs, alors que la fraction restante (~20%) est convertie en biomasse bactérienne et devient disponible pour les échelons trophiques supérieurs. Selon Azam and Malfatti (2007).

Dans la boucle microbienne décrite par Azam *et al.* (1983) les organismes procaryotes hétérotrophes (bactéries) de la colonne d'eau utilisent la MOD comme source d'énergie. Ainsi, la MOD libérée par le phytoplancton et dans une moindre mesure par des eucaryotes hétérotrophes est utilisée par les bactéries. Quand une quantité suffisante de MOD est fournie pour leur croissance, l'abondance des bactéries est régulée par des flagellés de petite tailles (3 à 10 µm), qui sont à leur tour broutés par du microzooplancton (10 à 80 µm). Ainsi, l'énergie libérée au travers de la MOD par le phytoplancton est réintégrée dans la chaîne trophique via la boucle microbienne. Par la suite, Fenchel (2008) a proposé de compléter ce modèle par une revue des études portant sur la boucle microbienne depuis Azam *et al.* (1983), en y intégrant de nouveaux acteurs et en prenant en compte la diversité des communautés microbiennes et l'hétérogénéité spatiale des communautés ultraplanctoniques. Ainsi, il apparaît clair que des organismes procaryotes autotrophes comme les cyanobactéries et notamment *Synechococcus* et *Prochlorococcus* jouent un rôle majeur en tant que producteurs primaires, notamment dans les eaux oligotrophes (Vaulot and Partensky, 1992; Partensky *et al.*, 1999). Les virus pourraient aussi être un des acteurs majeurs de la boucle microbienne de par leur abondance dans l'eau de mer (10^9 particules virales par millilitre) (Fuhrman, 1999; Needham *et al.*, 2017). Plusieurs études ont montré que les virus pouvaient générer de la MOD par des processus de lyse cellulaire (Riemann and Middelboe, 2002; Middelboe and Jörgensen, 2006). Ainsi, la boucle virale est communément intégrée à la boucle microbienne dans le fonctionnement des écosystèmes microbiens (Riemann and Middelboe, 2002). Ces évènements de mortalité augmentent la concentration de MOD et l'accumulation des bactéries en patch, forme de vie « attachée » qui peut être assimilée à du biofilm et appelé neige marine. Cette neige marine peut sédimenter, être remise en suspension dans la colonne d'eau ou déplacée verticalement selon le régime hydrodynamique. Ainsi, la colonne d'eau doit être considérée comme un système dynamique, où les processus biologiques peuvent être différents dans l'espace selon les conditions environnementales du milieu (Fenchel, 2008).

Dans les zones côtières où la pression anthropique est forte, les changements de conditions environnementales, tels que l'augmentation de la température, l'acidification de l'eau, l'eutrophisation, l'augmentation de l'intensité lumineuse peuvent altérer le fonctionnement physiologique et le comportement des microorganismes conduisant à des changements de structure, de répartition spatiale et de dynamique temporelle des communautés microbiennes (Doney *et al.*, 2012). Ces différences entre les milieux océaniques

et côtiers, dues aux gradients naturels et anthropiques peuvent conduire à la modification du fonctionnement global de l'écosystème (Halpern *et al.*, 2008; Doney *et al.*, 2012). L'anthropisation des écosystèmes côtiers peut aussi augmenter l'agrégation des microorganismes sur des particules ou des surfaces immergées et par conséquent promouvoir la formation de biofilms marins qui peuvent modifier les processus biogéochimiques et le fonctionnement des écosystèmes marins côtiers (Dang and Lovell, 2016).

I.1.3. Les communautés microbiennes associées à une surface : le biofilm

I.1.3.1. Définition des biofilms marins et conséquences économiques et écologiques liées au biofilm marin

Dans l'environnement marin, les microorganismes privilégient généralement un mode de vie sessile ou en agrégats au mode de vie planctonique. Bien qu'elle ait été beaucoup moins étudiée, la biomasse microbienne à l'échelle de la biosphère qui se développerait sous forme de biofilm est estimée à 80%. Dans les océans, les biofilms sont retrouvés sur toutes les surfaces immergées (Figure I-6). Les cellules microbiennes forment des agrégats au niveau de la microcouche de surface, appelés biofilms gélatineux ou neuston (Wurl and Holmes, 2008), bien que le mélange par le vent et les vagues de la couche de surface puisse empêcher la stabilité à long terme des communautés de bactérioneuston. Hormis le neuston, toutes les particules biotiques et abiotiques offrent aussi une surface d'attachement qui est généralement fortement colonisée (Zettler *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Mestre *et al.*, 2017) (Figure I-6). Lors d'un bloom phytoplanctonique, une grande proportion des procaryotes hétérotrophes peut se fixer au phytoplancton et au zooplancton comme biofilm épibiotique. D'une façon plus générale, de nombreux organismes multicellulaires sessiles comme les macroalgues sont concernés par ce phénomène d'épibiose (Wahl *et al.*, 2012; Dang and Lovell, 2016). Les particules minérales sont aussi fortement colonisées (Lee *et al.*, 2015). Les agrégats de matière organique sont abondants et représentent des sites de colonisation pour les microorganismes. Ainsi, la neige marine est densément peuplée par un grand nombre d'espèces microbiennes métaboliquement très actives (Simon *et al.*, 2002; Grossart *et al.*, 2006; Grossart, 2010). Les débris plastiques (plastiphère) accumulés dans les océans

représentent une source émergente de surfaces colonisables par les microorganismes (Zettler *et al.*, 2013; Amaral-Zettler *et al.*, 2015; Oberbeckmann *et al.*, 2015; Bryant *et al.*, 2016).

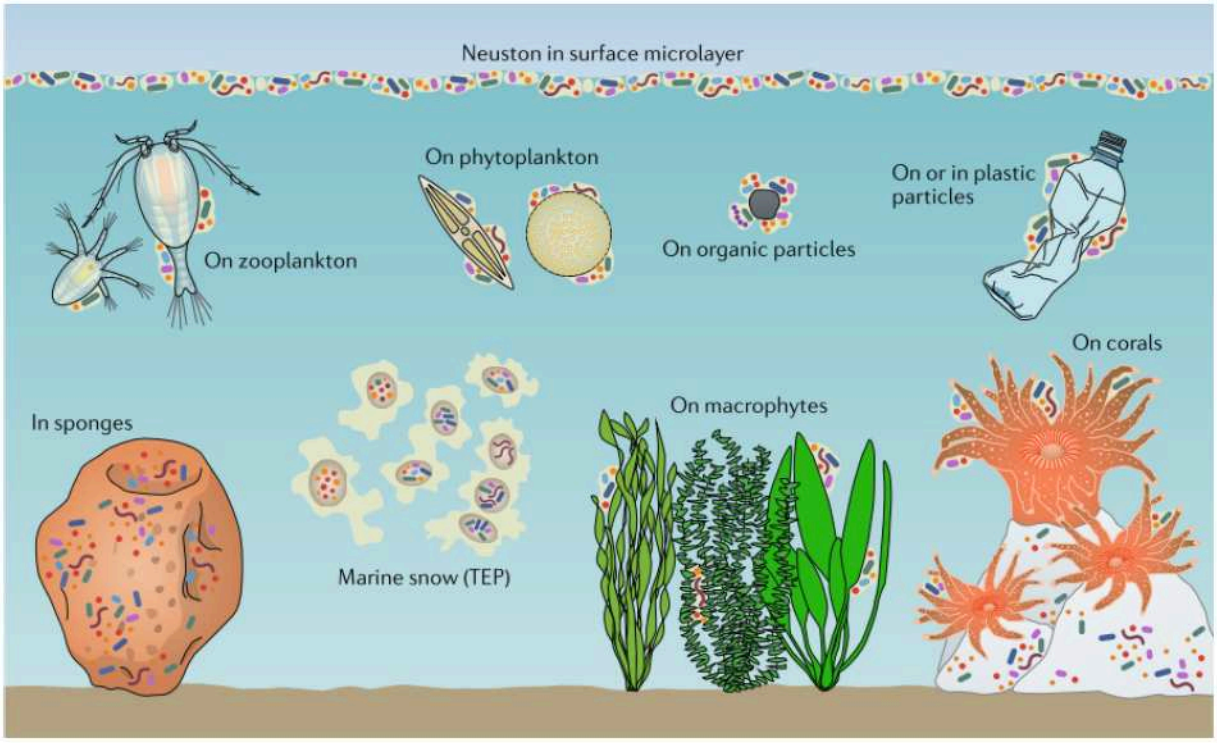


Figure I-6 Surfaces colonisables par les microorganismes dans les océans (Flemming and Wuertz, 2019).

C'est en 1943 que Zobell constate pour la première fois des bactéries fixées à la surface d'une bouteille en verre (Zobell, 1943). La notion de biofilm est proposée pour la première fois par Costerton *et al.* (1978) pour décrire les populations bactériennes enrobées dans une matrice extracellulaire qui adhèrent entre elles et à une surface, le tout formant une structure en trois dimensions. Aujourd'hui, le biofilm est défini comme un agrégat de microorganismes adhérés à une surface et insérés dans une matrice polymérique extracellulaire autoproduite (Myckatyn *et al.*, 2016). Les organismes présents dans un biofilm sont très diversifiés et principalement représentés par des bactéries, des cyanobactéries, des microalgues incluant les diatomées, des fungi microscopiques, des flagellés hétérotrophes et des ciliés sessiles (Salta *et al.*, 2013; Pochon *et al.*, 2015; Briand *et al.*, 2017; Debroas *et al.*, 2017; Kirstein *et al.*, 2018).

Dans le cadre des activités humaines dans le milieu marin, le biofouling, phénomène biologique qui se définit comme l'accumulation de microorganismes, de plantes ou d'animaux

sur des surfaces immergées, artificielles ou non (Rascio, 2000), apparait sur des surfaces très variées comme les coques de bateaux, les structures portuaires, les pipelines, les pontons, les structures aquacoles et les plateformes pétrolières (Figure 7).

Figure I-7 Biofouling présent sur différentes surfaces biotiques et abiotiques. A : coque d'un bateau (source : https://www.alamyimages.fr/photos-images/hull-fouling.html); B : bouteille en verre (source : https://www.alamy.com/sea-trash-image221779260.html); C : roche (source : http://janeodw1.blogspot.com); D : Seau en plastique (source : http://www.anthropocenemagazine.org/2017/10/afin-que-les-coraux-mangent-moins-de-plastique-nous-devons-lui-donner-mauvais-gout/?lang=fr); et E : coquille de crabe (source : http://images.4ever.eu/animaux/sauvages/crabe-240937).

Ainsi, les activités maritimes impliquant des navires sont notamment très touchées par ce phénomène qui engendre des coûts économiques et écologiques importants, liés à l'augmentation de la consommation en carburant et des gaz à effet de serre émis dans l'atmosphère (Rascio, 2000). La dégradation de matériels, comme les coques de bateaux et les pontons par des phénomènes de corrosion notamment dus aux bactéries sulfato-réductrices et méthanogènes, entraine des problèmes économiques importants (Fang *et al.*, 2002; Little and Lee, 2014). En aquaculture, le biofouling sur les cages d'élevage diminue les volumes d'ouverture vers l'extérieur et donc diminue la circulation des nutriments et des déchets. Ainsi, le biofouling diminue grandement les rendements d'élevage. D'un point de vue

écologique, le biofouling sur les navires est considéré comme l'un des éléments majeurs responsables du transport d'espèces non-indigènes et potentiellement envahissantes. Un des moyens les plus répandus pour lutter contre le biofouling reste l'utilisation de revêtements antifouling. Même si des alternatives existent sur le marché (Lejars *et al.*, 2012), la plupart des revêtements utilisés sont encore des peintures contenant des biocides capables de détruire, repousser ou bloquer l'adhésion et/ou la croissance des organismes. Ainsi, l'utilisation au cours des siècles de contaminants comme le plomb (Pb), le mercure (Hg), l'arsenic (As) ou plus récemment différentes formes du cuivre (Cu), et les oxydes de tributylétain (TBT) a eu pour conséquence une libération dans la colonne d'eau et une éventuelle accumulation dans les sédiments. Ces biocides sont donc actuellement reconnus pour engendrer des problèmes écologiques majeurs.

I.1.3.2. Avantage du mode de vie en biofilm et rôle dans l'écosystème marin côtier

Étant donné l'importance des biofilms marins quels que soient les environnements et le succès du mode de vie en biofilm, il n'est pas surprenant d'observer un grand nombre d'interactions multispécifiques et synergiques, qui confèrent et renforcent les avantages liés à ce mode de vie (Flemming *et al.*, 2016): le biofilm (i) fourni une diversité d'habitats, (ii) favorise l'accès et le stockage des nutriments et de la MO, (iii) augmente la protection face aux stress extérieurs (*i.e.* prédation, toxines, contaminants), (iv) facilite les interactions intracellulaires (communication, coopération, compétition, transferts horizontaux de gènes) et (v) accroît la tolérance à la dessiccation (Dang and Lovell, 2016; Flemming *et al.*, 2016). Le biofilm est ainsi une des formes de vie les plus répandues et les plus anciennes sur Terre (Stoodley *et al.*, 2002). Il joue un rôle important dans le contrôle des processus biogéochimiques de la plupart des éléments dans l'eau, les sédiments et les environnements de subsurface (Flemming *et al.*, 2016). Les surfaces immergées ont été décrites comme des « hot spots » d'activités biogéochimiques et les microorganismes associés jouent d'importants rôles dans de nombreux processus marins, incluant les cycles biogéochimiques du carbone ou de l'azote (Decho, 2000; Dang and Lovell, 2002b), la concentration et le transfert des contaminants dans le réseau trophique (Decho, 2000), le recrutement et le développement des larves d'invertébrés benthiques (Salta *et al.*, 2013) et la biodégradation des composés xénobiotiques

,` ! ! #^* : 2( )& !2. !1; 3 (^f 1&!T2T%2$ 6)* : ^2l 4 &!

7 E\Bh!ECM$ 5DGGBW.jjjt !&M[E?MA!ECMwZBIIB?H>W.jba t!TH?O CEIB!*et al.*W.jb,t !' HAAHM*et al.*W.

`jb- 8P!

!

8P6UPPU b. =* : -4., &3&4.B4(*&*4/-. ?4+, &

%E!O KAB!BC!>IENB!BD!I5@\GIHDGC!MHC!JKGVKO !>BHDAB!M@GO >GAB?!BC!+!@DE>BA!F!7&!IE!VG?O EDKGC!

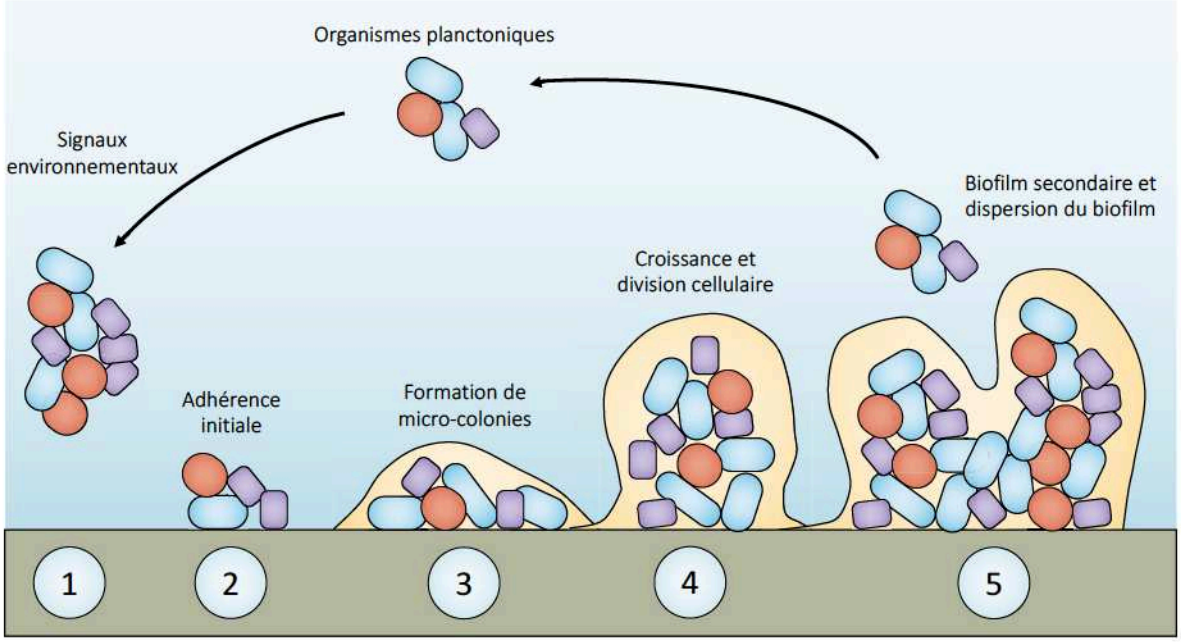
MH!VKO ! NGCMBKGCCECD!W7K&! I5EMX@KGC! JE ND@?KBCCB! ?@\B?AKI BW7KK&! I5EMX@KGC! JE ND@?KBCCB!

K?@\B?AKJIBW7K\&!IE!O EDH?EDKGC!MH!J KGKIO!BD!BCVKC!7\&!IB!M@DENXBO BCD!MBA!NBIIHIBA!7<KLH?B!+&!

71DGGNMBh!*et al.*W.jj`t !^ E?EAW.jj+t !/ GC?GBW.jj e8P!%E!VG?O EDKGC!MHC!JKGVKO !O KN?GJKBC!BAD!

L@C@?EIBO BCD!?E>KMBW!MB!I5G?MB!MB!cHBIcHBA!XBH?BA!i !cHBIcHBA!ZGH?A!P

!



!

<KLH?B!2R !: ?KCN<EIBA!@DE>BA!MB!VG?O EDKGC!MHC!J KGVKO !O KN?GJ KBCP!/ GMKK@ME>?YA!1DGGNMBh!*et al.*!7jj` 8t!^ E?EA!

7jj+ 8t!/ GC?GB!7jje8 P"DE>B!b!F!VG?O EDKGC!MHNKO !NGCMBKGCCECD!t!@DE>B!` !F!EMX@KGC!J END@?KBCCB!?@\B?AKI IB!t!

@DE>B!a!F!EMX@KGC!J END@?KBCCB!K?@\B?AKI IB!t!@DE>B!, !F!/ EDH?EDKGC!t!BD!@DE>B!+!F!' @DENXBO BCD!P

%E!>?BO KY?B!@DE>B!BAD!IE!VG?O EDKGC!MHC!VKO !>?KO EK?B!MBKNGCMBKGCCECD!P!#BIE!NGCAKADB!

BC!I5EMAG?>DKGC!MB!NGO >GA@A!G?LECKcHBA!MAKAGHA!AH?!IE!AH?VENB!KO O B?L@B!MBCA!I5BEH!MB!O B?P!

#BDDB!ENNHO HIEDKGC!MB!O GI@NIBA!?B>?@ABCDB!HCB!AGH?NB!MB!CHD?KO BCDA!BD!\E!N?@B!MBA!O KN?GR

CKNXBA!VE\G?EJI BA!i !I5EMX@KGC!MBA!O KN?GG?LECKAO BA!cHK!D?GH\BCD!EKCAK!MBA!CHD?KO BCDA!BD!MBA!

!

molécules organiques disponibles avec lesquelles ils peuvent engager des interactions spécifiques. L'approche des microorganismes de la surface est dépendante des propriétés dynamiques du milieu ainsi que des propriétés physico-chimiques respectives des surfaces conditionnées et des surfaces des microorganismes. A une distance éloignée de la surface, l'adhésion bactérienne engage des interactions faibles (*i.e.* forces de van der Waals, forces électrostatiques et interactions hydrophobes) (Dunne, 2002; Haras, 2005). A plus faible distance, la structure des bactéries doit être prise en compte. Ainsi, les microorganismes vont s'attacher à la surface grâce à des interactions électrostatiques et par une combinaison d'interactions chimiques. Tant que les microorganismes peuvent se désorber de la surface et retrouver leur état planctonique, la phase d'adhésion est dite réversible. L'adhésion irréversible des microorganismes est caractérisée par une réorientation de la cellule sur la surface. L'adhésion irréversible implique le déplacement de la bactérie à la surface vers le ou les lieux où elle pourra engager des interactions fortes avec la surface via des macromolécules de surface et des structures extracellulaires de type fimbriae, pili ou flagelles. Une fois que quelques microorganismes sont irréversiblement adhérés, l'adhésion de nouvelles cellules et/ou la multiplication des cellules déjà adhérées vont conduire à la formation de colonies qui vont recouvrir la surface. Ainsi, des interactions entre cellules vont avoir lieu à l'intérieur du biofilm récemment formé. L'une des interactions les plus étudiés entre microorganismes est le quorum-sensing (QS) (Waters and Bassler, 2005). Le QS produit et libère des molécules de signal chimiques dont la concentration augmente en fonction de la densité cellulaire. Les microorganismes détectent l'accumulation de ces molécules et modifient l'expression de certains gènes, notamment d'adhésion, de communication ou de production de molécules organiques. Ainsi, les microorganismes synchronisent leurs comportements à l'échelle d'une population et fonctionnent comme une communauté complexe à l'intérieur d'une matrice tridimensionnelle formée de protéines et de polysaccharides appelés EPS (pour « Extracellular Polymeric Substances ») (Flemming and Wingender, 2010). Des organismes planctoniques peuvent s'associer aux microorganismes déjà présents sur la surface grâce à cette matrice autoproduite, créant ainsi des macro-colonies (Dunne, 2002). Les organismes présents initialement semblent être capables en partie de favoriser ou d'inhiber ce recrutement, induisant ainsi la formation de biofilms microbiens multispécifiques diversifiés et complexes (Dobretsov, 2010). La matrice exoplymérique joue ainsi un rôle crucial dans l'adhésion, l'agrégation et la cohésion des biofilms microbiens (Flemming and Wingender, 2010;

Flemming *et al.*, 2016). La matrice formée, en plus de son rôle dans la formation et le maintien des cellules dans le biofilm, a de nombreuses fonctions parmi lesquelles : la rétention d'eau, la formation d'une barrière protectrice, l'adsorption des composés organiques (nutriments) et des ions inorganiques (métaux), l'activité enzymatique (digestion des macromolécules pour l'acquisition des nutriments), une source de nutriments ou l'échange d'information génétique (transfert horizontal de gènes) (Flemming and Wingender, 2010). Le détachement est la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm microbien. Il peut être considéré comme un phénomène passif, notamment dû aux mouvements d'eau environnante, provoquant des phénomènes d'érosion. Le détachement des microorganismes peut aussi être considéré comme un phénomène actif suite à un stress nutritionnel ou un manque d'espace, par lequel les microorganismes se détacheraient pour trouver de meilleures conditions de vie.

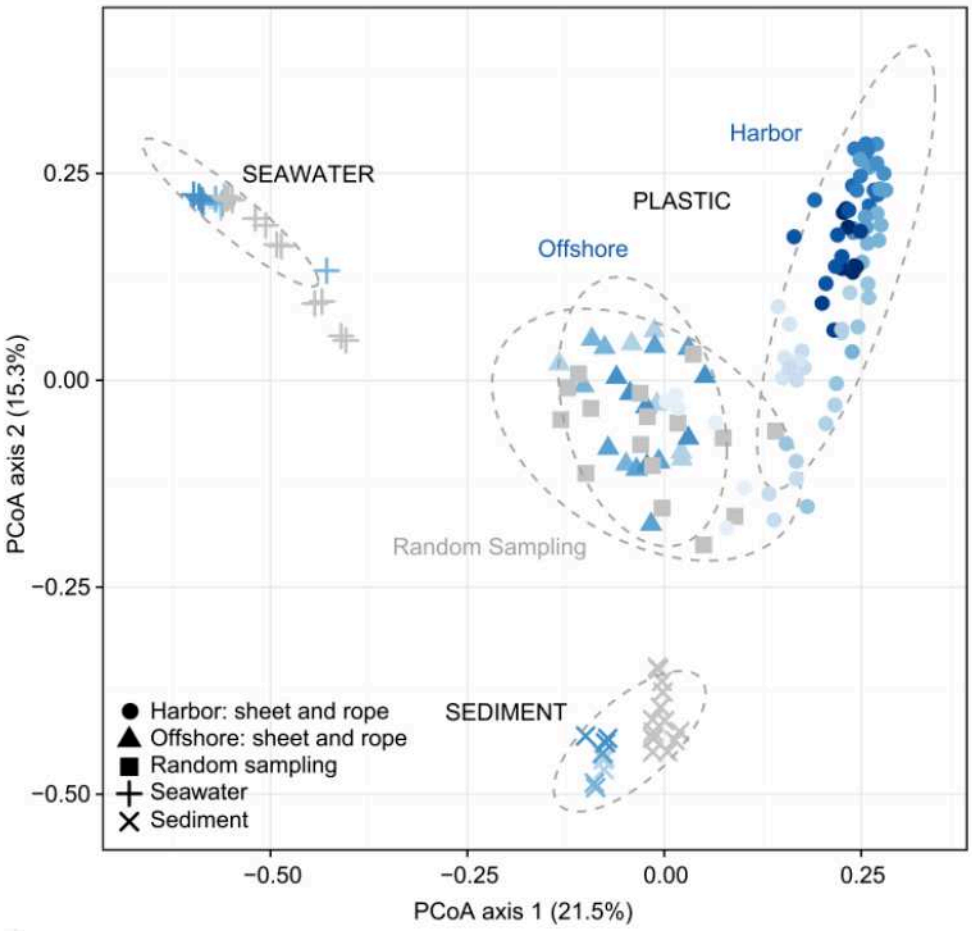
I.1.3.4. Densité et diversité des microorganismes dans les biofilms marins

Si la plupart des microorganismes planctoniques dans les océans sont considérés comme libres, il existe un débat pour savoir si les techniques d'échantillonnage actuelles permettent ou non de distinguer les cellules libres des cellules agrégées (Bar-On *et al.*, 2018). Ainsi, la fraction globale de cellules formant des biofilms peut être importante dans les océans, allant de 10^5-10^6 cellules par millilitre d'eau dans le neuston (Costerton *et al.*, 1987) à 10^8-10^{11} cellules par gramme de poids sec sur les particules (Flemming *et al.*, 2016). La densité des biofilms associés à des organismes vivants est comprise entre 1 x 10^3 et 27 x 10^3 cellules.cm^{-2} (Wahl *et al.*, 2012). La densité cellulaire sur des surfaces artificielles immergés est comprise entre 1.3 x 10^6 et 1.7 x 10^7 cellules.cm^{-2} (Camps *et al.*, 2014). Enfin, le comptage des procaryotes a révélé en moyenne 1.1 x 10^3 à 1.9 x 10^5 cellules.mm^{-2} sur les microplastiques (Dussud *et al.*, 2018). Toutefois, la densité et la diversité des biofilms est souvent dépendante de la surface et du temps de colonisation ainsi que des conditions environnementales (Salta *et al.*, 2013). Ainsi, la fraction globale des cellules fixées à une surface (particules minérales et microplastiques, débris organiques, phyto- et zooplancton, macrophytes) reste difficile à estimer.

Les biofilms sont classiquement étudiés par microscopie électronique à balayage (SEM) (De Tender, Schlundt, *et al.*, 2017) ou par microscopie confocale à balayage laser (Neu and Lawrence, 2015) pour obtenir une vision de la structure tridimensionnelle du biofilm ou

encore par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) (Harrison *et al.*, 2004b) pour identifier certains groupes bactériens. En ce qui concerne la diversité microbienne des biofilms, et même s'il existe des études basées sur des approches d'empreintes moléculaires (Webster and Negri, 2006) ou de séquençage SANGER (Dang *et al.*, 2008), la majorité des études sont récentes et donc principalement basées sur les NGS (Crespo *et al.*, 2013; Ortega-Retuerta *et al.*, 2013; Briand *et al.*, 2017; Dussud *et al.*, 2018; Oberbeckmann *et al.*, 2018; Pollet *et al.*, 2018; Corcoll *et al.*, 2019). Aujourd'hui, les études de diversité des biofilms sont majoritairement tournées vers la diversité des communautés associées aux microplastiques ou sur les mécanismes d'épibiose. Ces études ont notamment montré une nette distinction entre les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) associés à une surface et ceux de l'eau de mer environnante (Figure 6A) (Zettler *et al.*, 2013; Oberbeckmann *et al.*, 2014). Plus de 26 classes de bactéries hétérotrophes ont été identifiées dans les seuls échantillons de biofilms récoltés dans la mer du Nord (Figure 6B) (Kirstein *et al.*, 2018).

A



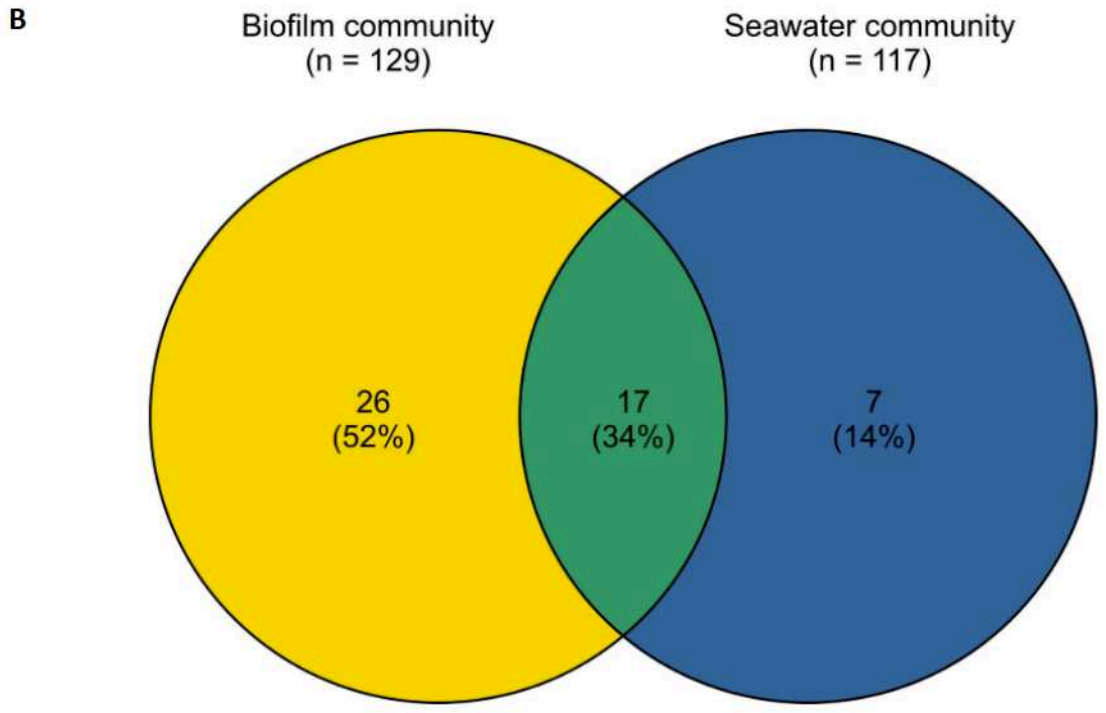


Figure I-9 Distinction entre les communautés microbiennes associées à une surface et celles de l'eau environnante. A : PCoA basée sur l'indice de dissimilarité Bray-Curtis calculé à partir de la table d'OTU des communautés microbiennes des échantillons de plastiques, de sédiments et d'eau de mer (De Tender, Devriese, *et al.*, 2017). B : Diagramme de Venn représentant le nombre de classes partagées ou non entre les échantillons d'eau de mer et de biofilm (Kirstein *et al.*, 2018).

Des études récentes ont confirmé une colonisation sur les surfaces plastiques par des communautés spécifiques comparées à celles de l'eau de mer environnante mais aussi à celles du sédiment (Amaral-Zettler *et al.*, 2015; De Tender *et al.*, 2015; Bryant *et al.*, 2016; Oberbeckmann *et al.*, 2016; Kirstein *et al.*, 2018). Des familles telles que les Oceanospirillaceae, les Flavobacteriaceae, les Alteromonodaceae, les Rhodobacteraceae et les Pseudoalteromonodaceae ont été identifiées comme des groupes clés de la colonisation précoce des surfaces immergés dans le milieu marin côtier (Dang and Lovell, 2002b; Dang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Pollet *et al.*, 2018). Parmi ces études, certaines se sont attachées à étudier la succession des communautés bactériennes au sein du biofilm marin. Ainsi, les genres *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas* (Gammaprotobacteria) d'une part (Lee *et al.*, 2008) et *Roseobacter* (Alphaproteobacteria) d'autre part (Dang *et al.*, 2008) ont été observés durant les toutes premières heures d'immersion et sont donc considérés comme des genres pionniers de l'adhésion. Après plusieurs jours d'immersion, leur prédominance dans la

communauté diminue au profit de bactéries appartenant notamment aux Bacteroidetes, aux Cyanobacteria, et aux Firmicutes notamment qui sont alors considérés comme des colonisateurs secondaires du biofilm (Chung *et al.*, 2010). D'autres clades comme les Acidobacteria, les Verrucomicrobia et les Planctomycetes apparaissent lorsque le biofilm devient plus mature (Chung *et al.*, 2010; Pollet *et al.*, 2018). Le phylum des Proteobacteria reste tout de même le plus abondant quel que soit le stade d'évolution d'un biofilm marin avec pas moins de cinq classes représentées (Alpha-, Beta, Delta, Epsilon- et Gammaproteobacteria). Parmi les Deltaproteobacteria, plusieurs groupes sulfato-réducteurs (SRB pour « sulfate reducing bacteria »), comme les *Desulfobacula* sont apparus comme importants dans la composition des biofilms marins (Webster and Negri, 2006; Lee *et al.*, 2014; Mugge *et al.*, 2019) et participent activement au processus de biocorrosion (Kip and Veen, 2015).

Si les biofilms microbiens en milieu marin, notamment associés aux débris plastiques, rencontrent aujourd'hui beaucoup d'intérêt, leur étude n'en reste pas moins récente et les connaissances actuelles sur la structure des communautés, les fonctions associées et leurs mécanismes de régulation, sont encore trop peu nombreuses, notamment dans les écosystèmes côtiers. Ainsi, dans un contexte d'anthropisation toujours plus intense en zone côtière, l'étude des biofilms microbiens soumis à des perturbations toujours plus diverses et intenses apparaît nécessaire pour mieux comprendre le fonctionnement de ce compartiment mais aussi de l'ensemble du microbiome.

I.1.3.5. Impact de l'environnement sur le biofilm microbien

Comme il a été décrit précédemment, il existe une multitude de surfaces colonisables (plastique, verre, bois, plancton, macrophytes, particules organiques et inorganiques) (Flemming and Wuertz, 2019). Chaque type de substrat est doté de caractéristiques qui lui sont propres. Par exemple, les plastiques qui représentent une source émergente de colonisation peuvent avoir une taille et une forme variable. L'abrasion des particules de plastique génère des microparticules de plastique encore plus nombreuses et augmentent la densité cellulaire, notamment lorsque les particules sont inférieures à 10 µm (Kooi *et al.*, 2017). En plus de la taille des particules, les caractéristiques chimiques, physiques et mécaniques des microplastiques semblent être parmi les principaux facteurs de contrôle de

la diversité des biofilms (Dobretsov *et al.*, 2013; Zettler *et al.*, 2013; Ogonowski *et al.*, 2018). Ainsi, les analyses de diversité sur des microplastiques de type polyéthylène téréphtalate (PET) et polypropylène (PP) ont montré des communautés enrichies en Alphaproteobacteria, notamment la famille des Rhodobacteraceae, en Gammaproteobacteria et en bactéries hydrocarbonoclastes en Mer des Sargasses (Zettler *et al.*, 2013), mais aussi dans la Mer du Nord (Oberbeckmann *et al.*, 2014; De Tender *et al.*, 2015; Oberbeckmann *et al.*, 2016; De Tender, Devriese, *et al.*, 2017). Enfin, des membres du genre *Vibrio*, potentiellement pathogènes, ont été détectés abondants sur des microparticules de PP en Atlantique Nord (Zettler *et al.*, 2013). La différence de communautés entre PET et PP (Zettler *et al.*, 2013; Ogonowski *et al.*, 2018) ou entre le PET et le verre (Oberbeckmann *et al.*, 2016) peut être expliquée notamment par les différences d'hydrophobicité ou de rugosité entre substrats (Ogonowski *et al.*, 2018). Toutefois, des études récentes ont montré que les communautés de biofilm seraient plus fortement influencées par des variations spatiales et temporelles des paramètres environnementaux que par le type de substrat colonisé (Lee *et al.*, 2008, 2014; Witt *et al.*, 2011; Oberbeckmann *et al.*, 2014, 2015). La localisation géographique (Zhang *et al.*, 2019) et la profondeur (Webster and Negri, 2006; Bellou *et al.*, 2012) des biofilms sont des facteurs importants expliquant les différences de composition des biofilms marins. Ces différences sont généralement dues aux variations des paramètres physico-chimiques du milieu environnant comme la quantité de nutriments (Briand *et al.*, 2012; Lawes *et al.*, 2016), la salinité et la température (Lau *et al.*, 2005; Briand *et al.*, 2017), le pH et l'oxygène dissous (Nayar *et al.*, 2004) et l'hydrodynamisme (Catão *et al. Submitted*). Ainsi, Briand *et al.* (2017) ont montré que la composition des communautés microbiennes des biofilms étudiés à Toulon (Mer Méditerranée, France) était très différente de celle de Lorient (Océan Atlantique, France) et principalement influencée par des températures et salinités des eaux plus élevées à Toulon alors que les concentrations en nutriments et COD étaient plus importantes à Lorient. Une autre étude dans la rade de Toulon a montré qu'un hydrodynamisme élevé avait limité le développement du biofilm et modifié sa composition microbienne (Catão *et al. Submitted*). Dans le même sens, (De Tender, Devriese, *et al.*, 2017) ont montré que la formation du biofilm en Mer du Nord a été stimulée dans un environnement semi-protégé, où l'hydrodynamisme est faible et l'eau enrichie en nutriments, alors que la formation des biofilms en milieu océanique ouvert avait été fortement perturbée par les conditions environnementales, et notamment par le mouvement des masses d'eau.

En plus du type de substrat, de la localisation et des variations spatiales des conditions physico-chimiques, plusieurs études ont montré des variations temporelles, notamment saisonnières de la composition des biofilms marins liées aux variations temporelles des conditions environnementales (Oberbeckmann *et al.*, 2014, 2016; Briand *et al.*, 2017). De Tender, Devriese, *et al.* (2017) propose d'étudier la composition de biofilms marins récemment formés à différentes périodes de l'année afin de mettre en évidence l'influence des variations saisonnières dans les processus de formation des biofilms. La dynamique temporelle des biofilms précoces (quelques jours) a été très peu étudiée (Pollet *et al.*, 2018). Elle a montré que la densité cellulaire augmentait rapidement au début de la colonisation de la surface immergée puis qu'elle atteignait un plateau après quelques semaines de résidence dans la rade de Toulon (Pollet *et al.*, 2018; Catão *et al.* Submitted). La composition des biofilms évolue aussi en fonction du temps d'immersion. Ainsi, les premiers colonisateurs (pionniers) sont souvent des bactéries appartenant aux genres *Alteromonas*, *Oleibacter* (Gammaproteobacteria), et *Roseobacter* (Alphaproteobacteria) alors qu'après quelques jours à semaines d'immersion, les Alphaproteobacteria apparaissent majoritaires dans les biofilms (Salta *et al.*, 2013; Dang and Lovell, 2016; Pollet *et al.*, 2018).

Toutefois, les généralisations sont encore très délicates pour conclure sur les facteurs de contrôle des variations spatio-temporelles des communautés de biofilms microbiens marins et ce pour plusieurs raisons. La grande variété de substrats retrouvés dans la mer rend difficile l'interprétation de l'influence de paramètres environnementaux sur la composition des biofilms. Ensuite il très compliqué de connaître l'origine des communautés associées aux particules dans la colonne d'eau et leur passif d'exposition aux conditions environnementales. Ainsi, il apparaît complexe d'identifier les paramètres environnementaux responsables de la structure des communautés de biofilms sur les plastiques par exemple. Enfin, très peu d'études multi-sites à l'image des missions océanographiques à grande échelle TARA pour les communautés planctoniques (de Vargas *et al.*, 2015; Sunagawa *et al.*, 2015) ont été réalisées pour caractériser les biofilms marins à l'échelle globale et tenter d'identifier des facteurs généraux ou locaux de structuration des biofilms (Zhang *et al.*, 2019). Il apparaît ainsi nécessaire d'augmenter nos connaissances sur ce compartiment au travers d'études de terrain dans des environnements contrastés en termes de contamination chimique mais aussi au travers d'études en laboratoire afin d'identifier spécifiquement l'impact de certains des éléments traces métalliques (ETM) par rapport à d'autres variables environnementales.

I.2. Les éléments traces métalliques dans les écosystèmes marins côtiers

Dans un premier temps, une présentation de la notion d'ETM, de leur origine et de leur comportement est proposée. Dans un second temps, la distribution des ETM dans la colonne d'eau et les sédiments des zones côtières est décrite. Enfin, les notions de spéciation et de biodisponibilité des ETM dans un contexte de toxicité vis-à-vis des microorganismes sont précisées.

I.2.1. Nature et origines des éléments traces métalliques

I.2.1.1. Notion d'élément trace métallique

Les métaux sont des éléments naturels dans l'environnement. Certains de ces éléments métalliques tels que le cuivre (Cu), le fer (Fe), le manganèse (Mn) et le zinc (Zn) sont essentiels à faible concentration pour le fonctionnement normal des cellules. D'autres en revanche sont toxiques même à de très faibles concentrations et n'ont aucune fonction biologique essentielle, comme l'argent (Ag), l'aluminium (Al), le cadmium (Cd), l'or (Au), le plomb (Pb) et le mercure (Hg) (Bruins *et al.*, 2000). Certains éléments inorganiques toxiques ne sont pas des métaux mais des métalloïdes. Les métalloïdes ont des propriétés à la fois métalliques et non métalliques. Ils sont présents sous la forme d'anions (groupements OH^-) et d'oxyanions (groupements O^-). Six éléments sont considérés comme des métalloïdes : l'antimoine (Sb), l'arsenic (As), le bore (B), le silicium (Si), le Germanium (Ge) et le tellure (Te). Tous les métaux/métalloïdes, essentiels ou non, sont toxiques pour les organismes au-dessus de certains seuils de concentration dans le milieu. Ainsi, le terme « éléments traces métalliques » est utilisé pour regrouper tous les métaux et métalloïdes dont la concentration est inférieure à 1 $g.kg^{-1}$ de matière sèche dans la croute terrestre ou inférieure à 0.1 $g.kg^{-1}$ de matière sèche chez les organismes vivants (Bourrelier *et al.*, 1998). Les ETM les plus connus pour leur toxicité sont l'As, le Cd, le Cr, le Cu, le Hg, le Ni, le Pb et le Zn (Fairbrother *et al.*, 2007). La composition relativement constante des composants majeurs de l'eau de mer démontre que la chimie de l'océan à large échelle reflète et intègre l'évolution de la Terre. En revanche, dans un écosystème marin côtier, le système est plus dynamique, complexe et la proximité avec le milieu terrestre peut apporter de nouveaux éléments, modifiant l'équilibre du milieu.

I.2.1.2. Origine et comportements des ETM dans les zones marines côtières

Le fonctionnement d'un écosystème côtier est complexe, en raison de la grande dynamique des processus ayant lieu à l'interface de multiples systèmes (terre, fleuve, mer, côte, large, air, sédiment) (de Souza Machado *et al.*, 2016). De ce fait, dans les écosystèmes côtiers les ETM ont diverses origines, qui peuvent être divisées en deux catégories : naturelles ou anthropiques (Figure I-10).

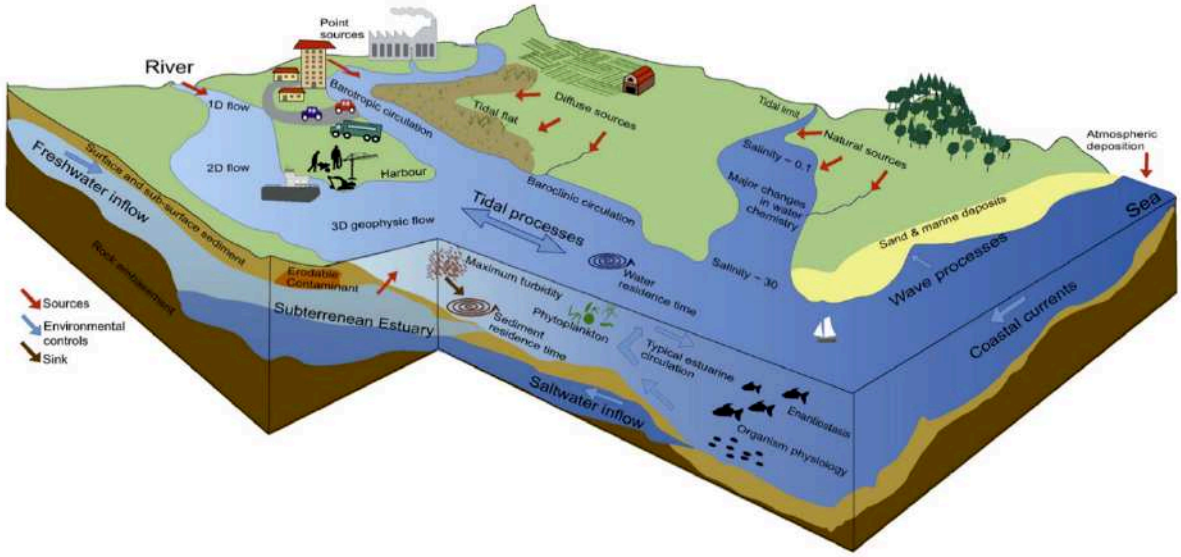


Figure I-10 Modèle conceptuel représentant (i) les sources et les puits des ETM ainsi que (ii) les variables et processus physiques, chimiques et biologiques régissant le comportement et la toxicité des ETM en milieu marin côtier. D'après Bianchi (2007) et de Souza Machado et al. (2016).

I.2.1.2.1. Les sources naturelles

L'érosion puis le transport par les vents et l'activité volcanique sont les deux principales sources naturelles des ETM dans l'environnement marin. A l'échelle globale, ces deux sources représentent près de 80% de l'apport naturel des ETM, les feux de forêts et les sources biogéniques représentant 10% de l'apport naturel, chacun (Callender, 2003). En Méditerranée, les cycles biogéochimiques des ETM sont en partie régis par les apports atmosphériques et les poussières sahariennes (Migon *et al.*, 2002).

I.2.1.2.2. Les sources anthropiques

L'utilisation des ETM dans nos sociétés implique une modification de la répartition des ETM dans l'eau de mer et leur dissémination à l'échelle mondiale. Cette contamination d'origine anthropique a un impact environnemental important et grandissant dans les zones côtières, avec le développement des activités humaines. L'influence des cours d'eau dans les zones côtières est très importante et peut constituer la principale source d'ETM dans certaines régions (Ludwig *et al.*, 2009; Oursel *et al.*, 2013), notamment lors d'évènements de forte intensité pluvieuse (Radakovitch *et al.*, 2008). Les apports anthropiques des cours d'eau sont généralement variés et comprennent des déchets industriels, les effluents (traités ou non) de station d'épuration des eaux usées (STEP) et les eaux de ruissellement provenant des régions agricoles. Les activités industrielles et minières quant à elles émettent des ETM dans l'atmosphère au travers des processus métallurgiques ou par des particules chargées de métaux. Le dépôt atmosphérique constitue ainsi la deuxième source anthropique d'apport des ETM dans les écosystèmes marins côtiers, après l'apport fluvial (Callender, 2003). Le trafic maritime et l'utilisation de peintures antifouling peuvent également être une source d'apport d'ETM dans le milieu marin. Enfin, le compartiment sédimentaire peut être une source importante d'ETM dans les écosystèmes marins côtiers. Les transferts d'ETM des sédiments vers la colonne d'eau sont régis par plusieurs processus tels que : (i) la mobilisation ou l'immobilisation des éléments dans les sédiments (Dang, 2014; Dang, Lenoble, *et al.*, 2014), (ii) la diffusion d'ETM dissous (Bruland *et al.*, 2013; Rigaud *et al.*, 2013) et (iii) la remobilisation de particules vers la colonne d'eau (Saulnier and Mucci, 2000).

I.2.1.2.3. Comportement des ETM

La présence en forte concentration des ETM dans l'environnement peut être d'origine naturelle, mais dans la plupart des cas les sources anthropiques sont la cause majeure d'une contamination en ETM. De plus, les activités agricoles, métallurgiques, énergétiques, industrielles et urbaines conduisent à une augmentation significative des concentrations en Cd, Cu, Pb et Zn principalement (Callender, 2003; Migon, 2005; Turner, 2010; The Mermex Group *et al.*, 2011). Dans les zones côtières, telles que la rade de Toulon, des gradients de

salinité peuvent être observés. Ces gradients sont connus pour affecter le comportement des différents ETMs dissous et particulaires par des processus de transformation tels que l'adsorption/sorption, l'oxydation, la réduction et la complexation. La conservativité est un phénomène qui correspond au comportement d'un métal qui ne sera pas impliqué dans un processus de transformation et dont la concentration varie linéairement avec la salinité. Au contraire, un processus qui va altérer la concentration d'un métal le long du gradient de salinité va générer une évolution non conservative de l'élément.

Le Cd est un élément naturellement présent dans l'environnement marin côtier du fait des activités volcaniques et de l'érosion des sols mais les émissions majeures sont d'origine anthropique (production et utilisation dans les batteries, pigments, traitements de surface et engrais). Son cycle naturel est l'un des plus perturbés par l'activité humaine. En zone côtière, le Cd forme généralement des complexes très stables avec les chlorures ($CdCl_2$), conduisant à une évolution non conservative (Wildgust and Jones, 1998; Waeles *et al.*, 2005, 2008, 2009). Ces chlorocomplexes joueraient un rôle prépondérant dans les échanges dissous/particulaires de Cd en milieu côtier (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1984).

Les émissions de Cu dans l'environnement peuvent avoir une origine naturelle (érosion, volcanisme, végétation) mais les principaux apports sont anthropiques (industries de la métallurgie et du bois, produits phytosanitaires, fertilisants, rejets de STEP, peintures antifouling) et conduisent à la contamination des écosystèmes marins côtiers (Callender, 2003; Turner, 2010; de Souza Machado *et al.*, 2016). En milieu côtier, le Cu a montré un comportement non conservatif dû à des phénomènes de désorption des particules en suspension ou du sédiment en faveur de la phase dissoute (Waeles *et al.*, 2008, 2009; Vink, 2009; Monnin *et al.*, 2018). Sans complexation avec la MO, les concentrations en ions libres (Cu^{2+}) sont approximativement 20 fois inférieures aux concentrations dissoutes. Toutefois, en présence de MO, la majeure partie du Cu dissous sera complexée (Ndungu, 2012). Ainsi, dans les zones où les processus de remise en suspension de sédiments sont importants, l'apport de particules dans la colonne d'eau va entrainer la complexation du Cu par la MOD et favoriser la phase dissoute (Vasconcelos and Leal, 2001; Gee and Bruland, 2002; McGeer *et al.*, 2004; Semeniuk *et al.*, 2015).

Le plomb est naturellement présent dans l'environnement marin du fait des activités volcaniques et de l'érosion des sols, mais les principales sources sont d'origine anthropique (production de batteries, alliage, peintures antifouling, carburant). Le Pb est généralement

stocké dans les sédiments et peut potentiellement être rendu mobile à nouveau (remobilisé) lors d'épisodes de remise en suspension des sédiments. Dans le milieu côtier, le Pb peut avoir un comportement conservatif ou non conservatif selon les estuaires. Le Pb peut former des complexes avec les chlorures (Cl^-) mais peut aussi être adsorbé sur les particules ou co-précipité avec des oxydes de Fe ou de Mn (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1984). L'adsorption du Pb, et des ETMs en général, sur les particules en suspension est un processus influencé par la surface spécifique et la nature des particules (Elbaz-Poulichet *et al.*, 1984).

Enfin, le zinc est un élément naturellement présent dans l'écorce terrestre, dans les roches magmatiques, les sédiments argileux et les schistes. Les émissions dans l'environnement marin côtier peuvent avoir une origine naturelle (érosion et volcanisme), mais les principaux apports sont anthropiques (sources minières et industrielles, épandages agricoles, sources urbaines, peintures anti-fouling). Dans les zones portuaires, le zinc est introduit à partir des eaux de traitements, de la métallurgies (Araújo *et al.*, 2016) et par les peintures anti-fouling, ce composé ne faisant pas l'objet d'une réglementation au contraire d'autres biocides tels que Cu (Turner, 2010). Enfin, 98% du Zn dissous à la surface de la colonne d'eau serait complexé avec la MO (Gee and Bruland, 2002; Crawford *et al.*, 2003; Bruland *et al.*, 2013).

I.2.2. Distribution des ETM dans les zones marines côtières

I.2.2.1. Distribution des ETM dans la colonne d'eau

Malgré toutes ces sources de contamination, les concentrations en ETM dissous restent assez faibles et homogènes à l'échelle de la Méditerranée (Tankere and Statham, 1996; Morley *et al.*, 1997), et du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les mers et les océans de la planète (Sohrin and Bruland, 2011; Bruland *et al.*, 2013). Toutefois, en Méditerranée, des concentrations plus élevées ont été retrouvées dans certaines zones côtières. Ainsi, des concentrations de Cd comprises entre 0.044 à 0.064 nM dans l'Est de la Méditerranée (Morley *et al.*, 1997), 0.070 et 0.100 nM dans la Mer Adriatique (Tankere and Statham, 1996), et 0.018 et 0.278 nM dans la mer Égée (Zeri and Voutsinou-Taliadouri, 2003) ont été mesurées. Des concentrations en Cd supérieures à 0.3 nM peuvent être mesurées en zone côtière comme la baie de Marseille (Oursel *et al.*, 2013) ou la rade de Toulon (Rossi and Jamet, 2008; Jean *et al.*,

2012). Des concentrations moyennes en Cu de 7.14 nM dans l'Adriatique (Tankere and Statham, 1996), de 2.80 nM dans le Golfe du Lion (Morley *et al.*, 1997), comprises entre 0.558 et 6.85 nM dans la Mer Égée (Zeri and Voutsinou-Taliadouri, 2003) et de 1.50 nM dans l'est de le Méditerranée (Morley *et al.*, 1997). Là encore, des concentrations beaucoup plus élevées, atteignant des dizaines de nM dans certaines zones côtières sont mesurées (Rossi and Jamet, 2008; Jean *et al.*, 2012; Oursel *et al.*, 2013; Cindrić *et al.*, 2015). Le Pb dissous a été mesuré en moyenne à 0.085 nM dans les eaux de surface de la Méditerranée (Morley *et al.*, 1997), 0.1 nM dans l'Adriatique (Tankere and Statham, 1996) et à des concentrations maximales proches de 5 nM dans certaines zones côtières très contaminées (Rossi and Jamet, 2008; Jean *et al.*, 2012; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). Enfin, le Zn dissous est proche de 2 nM dans l'adriatique (Tankere and Statham, 1996), de l'ordre de 4-5 nM dans l'est de la Méditerranée (Morley *et al.*, 1997) et peut dépasser les 150 nM dans des zones portuaires ou à l'embouchure de fleuve (Oursel *et al.*, 2013). Ainsi, dans certaines zones très contaminées de la Mer Méditerranée, les concentrations de certains ETMs peuvent être plus de 250 fois plus élevées que le bruit de fond géochimique de la Mer Méditerranée, mesuré par Morley *et al.* (1997).

I.2.2.2. Les sédiments : puits et sources d'ETM

Le compartiment sédimentaire marin qui recouvre les fonds des océans est composé de particules solides et d'eau interstitielle. Il est constamment alimenté par les particules de la colonne d'eau qui sédimentent. Or, la forte affinité de certains ETM pour les particules en suspension va entrainer une augmentation de la concentration en ETM dans les sédiments sous l'effet de la sédimentation des particules. Les sédiments sont donc qualifiés de réservoir puisqu'ils ont la capacité de stocker sur une échelle de temps plus ou moins longue les particules et les contaminants associés. Les sédiments des zones côtières sont particulièrement chargés en ETM car ce sont des zones d'accumulation de particules et de forte contamination en ETM.

Lors d'épisodes de remise en suspension des sédiments contaminés (tempêtes, trafic maritime ou épisodes de dragage par exemple), le compartiment sédimentaire devient alors une source de contamination pour la colonne d'eau (Saulnier and Mucci, 2000; Zoumis *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006; Tankere-Muller *et al.*, 2007; Kalnejais *et al.*, 2010; Dang, Schäfer, *et al.*,

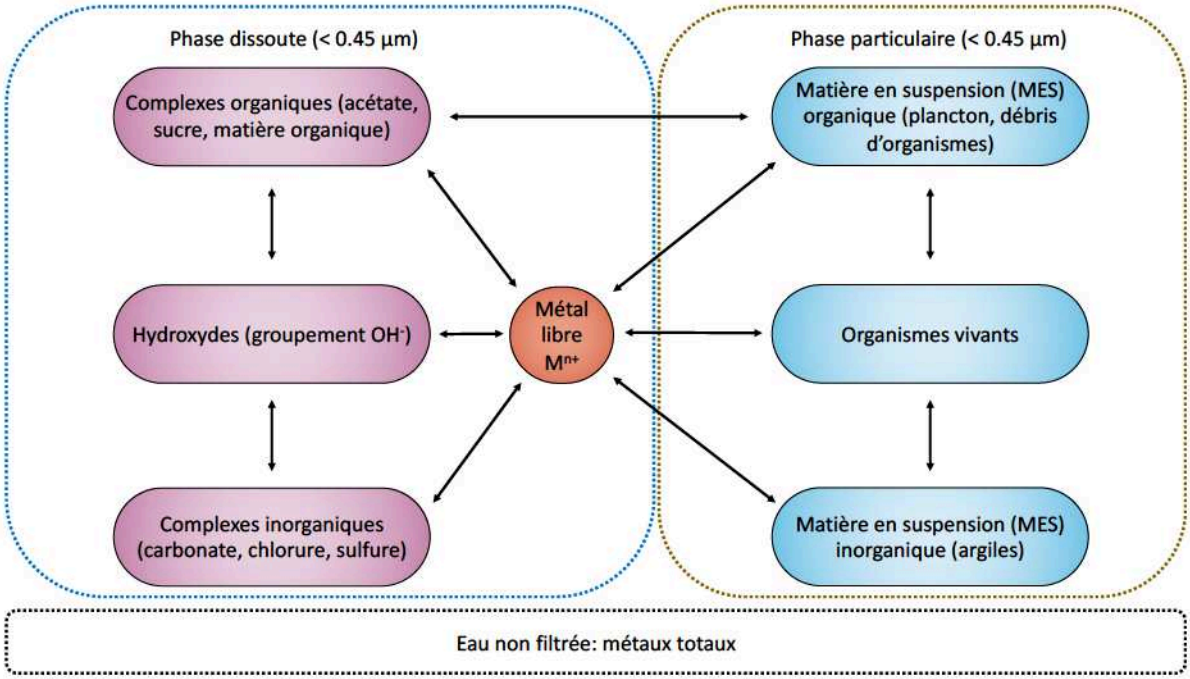
2015). Des transferts d'ETM entre particules et phase dissoute interviennent en effet via des processus de sorption-désorption, et représentent un facteur potentiel de danger pour les écosystèmes marins côtiers et les organismes associés.

I.2.3. Spéciation et biodisponibilité des ETM

I.2.3.1. Spéciation des ETM

L'étude de la toxicité des ETM dans les eaux naturelles passe par la connaissance de leur spéciation car leur toxicité varie en fonction de la forme chimique sous laquelle un ETM est présent (Tessier and Turner, 1995). La spéciation chimique d'un ETM correspond à l'ensemble de ses formes/espèces chimiques présentes dans un écosystème donné (Figure I-11). La spéciation chimique des éléments dans la colonne d'eau est régie par plusieurs mécanismes : (i) la complexation, (ii) l'adsorption, (iii) l'échange d'ions, (iv) la précipitation et (v) l'absorption (Flores-rodriguez, 1992). Un certain nombre de ligands, inorganiques et organiques vont ainsi gouverner la spéciation des ETM et la formation de complexes plus ou moins stables. Dans les milieux aquatiques, les ETMs peuvent être sous deux formes : particulaire et dissoute. Cette distinction arbitraire est généralement obtenue par la filtration de l'eau à 0.45 µm. Au sein de la phase dissoute, les ETM peuvent être classées selon plusieurs catégories : (i) les ions libres, (ii) les complexes labiles organiques ou inorganiques, et (iii) les complexes non labiles organiques ou inorganiques et (iv) les hydroxydes (Tessier and Turner, 1995).

La spéciation est influencée par les conditions physico-chimiques (*i.e.* pH, potentiel redox, salinité, concentration et composition des matières en suspension, quantité et qualité de matière organique dissoute) du milieu, qui peuvent être soumises à des variations importantes d'origine naturelle ou anthropique, notamment dans les zones côtières.



<KLH?B!2Fbb!1NX@O E!MB!IE!A>@NKEDKGC!MBA!&(/ AWMBA!KCDB?ENDKGCA!BCD?B!IBA!MKW@?BCDBA!VG?O BA!NXKO KcHBA!BD!MBA!
KCDB?ENDKGCA!BCD?B!IBA!&(/ A!BD!IBA!G?LECKAO BA!\K\ECDA!' 5E>?YA!THWB!ECM!#XEIO B?A!7bf--8 P!

8P0UPPP M4.<4;9. , 4?4(4)-&<; &%J &

4 C!O @DEI!BAD!NGCAKM@@!NGO O B!JKGMA>GCKI B!cHECMK!>BHD!,, D?B!EAAKO K@!>E?!HC!G?LECKAO B!BD!
EKCAK!KCDB?V@B?!E\BN!ABA!VGCNDKGCA!7: EcHKC!*et al.*W\jj`t !=KC] W\jjf8 P!%E!>?KCNK>EIB!KM@!MB?KY?B!
IB!NGCNB>D!MB!JKGMA>GCKIKIKD@BAD!cHB!IBA!BVVBA!DG_KcHBA!MBA!&(/ !CB!M@BCMBCD!>EA!ABHIBO BCD!
MB!IBH?A! NGCNBCD?EDKGCA! DGDEIBA! MECA! I5BC\K?GCCBO BCD! O EKA! EHAAK! MB!IE! V?ENDKGC! MB! NBA!
NGCNBCD?EDKGCA! cHK! >BHD!,, D?B! NE>D@B! BDsGH! EAAKO K@B! >E?! IBA! G?LECKAO BAP! 2I! BAD! AGH\BCD!
NGCAKM@@!cHB!IBA!&(/ !AGHA!IBH?!VG?O B!KGCKcHB!7*e.g.*!#H`z W\pC`z 8!AGCD!>IHA!JKGMA>GCKI BA!cHB!
IBA!EHD?BA!VG?O BA!BD!MGCN!>IHA!DG_KcHBA!>GH?!IBA!G?LECKAO BA!\K\ECDA!7=EANGCNBIGA!ECM!%BEIW!
`jjb t!: EcHKC!*et al.*W\jj`t !#XBC!*et al.*W\jbj8 P!%BA!EHD?BA!VG?O BAWCGDEO O BCD!IBA!NGO >IB_BA!CGC!
IEJKIBA!AGCD!NGCAKM@?@BA!NGO O B! O GKCA! J KGMA>GCKI BA! BD! MGCN! O GKCA! DG_KcHBA! BC\B?A! IBA!
G?LECKAO BAP! (GHDBVGKAWNB?DEKCA!NGO >IB_BA!>BH\BCD! @IEIBO BCD!,, D?B!EAAKO K@A!>E?!NB?DEKCA!
G?LECKAO BAW>E?DKNK>ECD!EH!D?ECAVB?D!MBA!@@O BCDA!MECA!IE!NXEKCB!D?G>XKcHB!7&LLIBDGC!ECM!
(X GOEAW\jj ,t !#XKEAAGCRLGHIM!*et al.*W\jb,t !' ECLW!1NX' VB?W!*et al.*W\jb+8 P!

%5J AG?>DKGC! BD! I5HDKKAEDKGC! MBA! O @DEH_! >E?! IBA! O KN?GG?LECKAO BA! 7J END@?KBA! BD!
HID?E>XhDG>IECNDGC!CGDEO O BCD8!E!@@!M@?KD>GH?!IE!>?BO KY?B!VGKA!>E?!m GGMECM!m ECL!7bf-a8 !

!

et Gonzalez-Davila (1995). Ce phénomène a ensuite été détaillé comme les concepts de « free ion activity model » (FIAM) et de « biotic ligand model » (BLM) pour évaluer quantitativement la quantité d'ETM qui interagit avec les organismes vivant dans les systèmes aquatiques (Paquin *et al.*, 2002; Amo and Agai, 2008; Chen *et al.*, 2010). Ces concepts sont basés sur le fait que les ETM interagissent avec des sites de fixation présents à l'interface organisme/environnement de manière similaire à la formation des complexes inorganiques décrit précédemment (Figure I-12) (Paquin *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2012; Ardestani *et al.*, 2014; Fein, 2017). Ces modèles prennent en compte le fait que les ligands présents sur ou dans les organismes entrent en compétition avec d'autres ligands biotiques ou abiotiques présents dans l'environnement. Cette compétition peut mener à deux situations : soit l'affinité des ETM est forte pour les ligands de l'environnement et des complexes stables, peu biodisponibles sont formés, soit leur affinité est plus forte pour les ligands biotiques et les ETM sont alors très biodisponibles. Les ligands organiques présents sur les organismes sont décrits comme des sites d'action de la toxicité. La complexation des ETM sur les sites d'action (ligands organiques) des microorganismes représente un processus déterminant dans la biodisponibilité des ETM (Di Toro *et al.*, 2001; Fein, 2017).

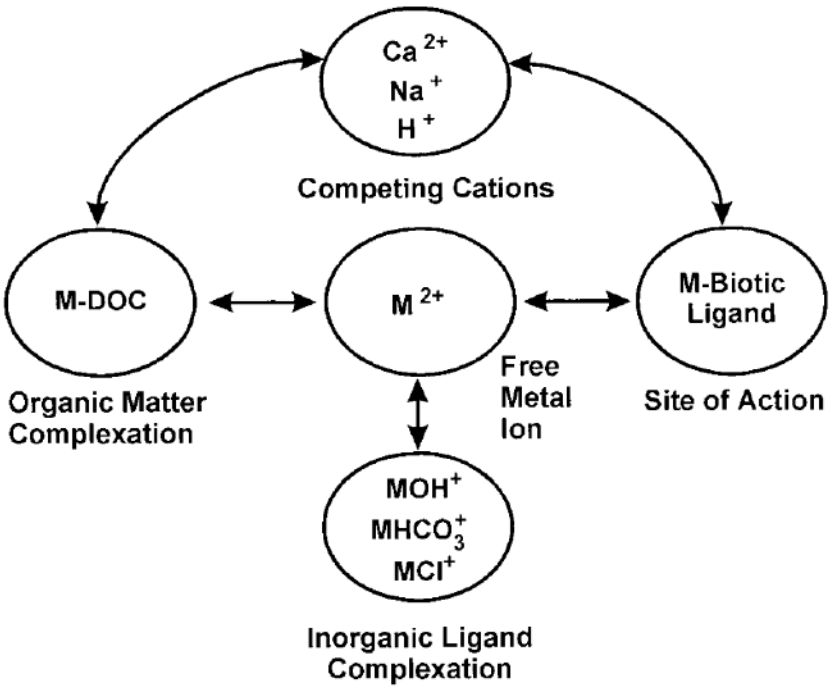


Figure I-12 Représentation schématique du concept de « biotic ligand model ». Le métal libre sous forme ionique (M^{2+}) peut interagir avec un ligand biotique (site d'action). Cette interaction peut être influencée par plusieurs

facteurs dont la compétition et la complexation. Différents cations peuvent entrer en compétition avec le métal libre sous forme ionique pour se fixer aux ligands biotiques des organismes. La compétition entre le carbone organique dissous (COD) ou des cations naturellement présents dans l'environnement marins et les métaux libres pour des ligands organiques et inorganiques, respectivement peuvent entrainer une réduction de la biodisponibilité des ions libres. M : élément trace métallique. D'après Di Toro et al. (2001).

Toutefois, dans le milieu naturel, la biodisponibilité des métaux va aussi dépendre des conditions physico-chimiques de la colonne d'eau, qui vont influencer la spéciation des ETMs et les interactions des ETMs avec les organismes. Les facteurs biologiques propres aux organismes exposés (taille, capacité à internaliser les ETMs, capacité de croissance et de reproduction) peuvent aussi influencer la spéciation des ETMs (Nordberg *et al.*, 2014). Ainsi, un ETM biodisponible pour un organisme ne l'est pas obligatoirement pour un autre. Bien que le concept de biodisponibilité soit relativement bien décrit aujourd'hui, encore très peu d'études ont été réalisées sur la biodisponibilité des ETMs sur des organismes unicellulaires (Sunda, 2012; Ardestani *et al.*, 2014; Flynn *et al.*, 2014; Fein, 2017). Les mécanismes de la toxicité des ETM et leurs effets sur les microorganismes à l'échelle cellulaire ont fait l'objet de nombreuses études et sont aujourd'hui bien connus. En revanche, les effets des ETM à l'échelle d'une communauté complexe de microorganismes restent encore très peu étudiés, notamment en milieu marin, ce qui fait le caractère innovant de ce travail de thèse.

I.3. Relations entre les éléments traces métalliques et les communautés microbiennes

Dans un premier temps, une présentation générale des mécanismes de toxicité des ETMs envers les microorganismes est proposée puis un focus sur les mécanismes de résistance chez les microorganismes planctoniques et en biofilm est réalisé. Enfin, plusieurs notions clés en écologie microbienne en lien avec une perturbation ainsi que les différents effets des ETMs sur les communautés microbiennes planctoniques et associées au biofilm seront décrits.

I.3.1. Mécanismes de toxicité des ETMs

Les mécanismes de toxicité des ETMs envers les microorganismes ont été grandement étudiés, et de nombreuses revues sont disponibles (Gadd and Griffiths, 1977; Silver, 1996; Silver and Phung, 1996; Nies, 1999; Lemire *et al.*, 2013). L'adsorption des ETMs sur l'enveloppe cellulaire des bactéries est la première étape fondamentale dans la biodisponibilité et la toxicité des composés chimiques dans les cellules (Nies, 1999; Flynn *et al.*, 2014). Les mécanismes d'adsorption et les taux d'adsorption des ETMs dépendent cependant des espèces microbiennes en présence, du développement éventuel d'un mécanisme de résistance par l'organisme cible, de son état physiologique et des conditions environnementales. Ainsi, les mécanismes mis en jeu dans l'exposition des cellules et la toxicité induite dépendent fortement de l'ETM considéré, de sa spéciation et de sa biodisponibilité. A titre d'exemple, il semble que le Cu soit l'ETM le plus toxique pour les bactéries en comparaison au Pb et au Zn, de par sa forte affinité aux ligands organiques (Nies, 1999; Ardestani *et al.*, 2014). Une fois les ETMs captés par la cellule et/ou internalisés, plusieurs mécanismes de toxicité vont pouvoir avoir lieu : (i) un dysfonctionnement des protéines et une perte de l'activité enzymatique, (ii) une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une réduction des antioxydants, (iii) une altération de la fonction membranaire, (iv) une interférence dans la capture des nutriments par compétition avec les ligands organiques, et (v) la génotoxicité créant des dommages irréversibles au niveau de l'ADN (Lemire *et al.*, 2013). Ces mécanismes de toxicité des ETMs ne sont pas exclusifs et les effets sur les microorganismes peuvent être le résultat d'une combinaison de plusieurs de ces mécanismes.

I.3.2. Mécanismes de résistance ou de tolérance : résister et s'adapter

La résistance aux ETMs est définie comme la capacité qu'a un microorganisme à continuer sa croissance en présence d'ETM seul ou combiné alors que la tolérance aux ETMs se définie comme la capacité d'un microorganisme à survivre mais pas à croître en présence d'ETM seul ou combiné (Figure I-13).

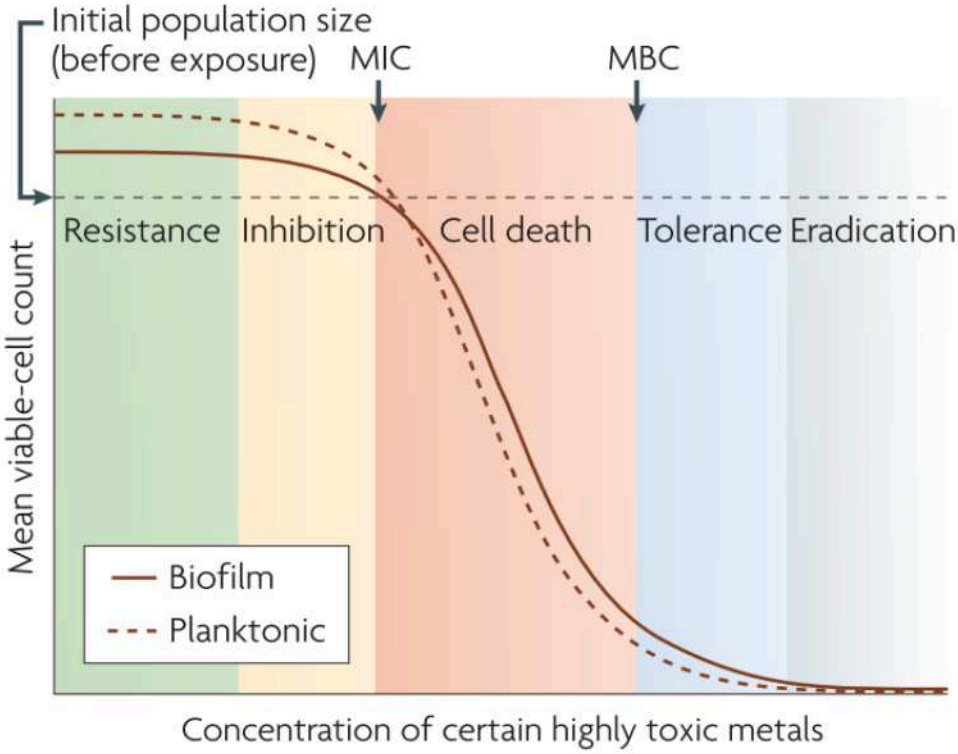


Figure I-13 Courbe dose-réponse en fonction du temps. MBC : Concentration bactéricide minimum représente conventionnellement la concentration d'un agent antimicrobien (antibiotique, biocide ou métal) qui tue au moins 99,9% de la population bactérienne ; MIC : Concentration inhibitrice minimale représente la concentration la plus faible de l'agent microbien qui stoppe la croissance de la population bactérienne. D'après Harrison *et al.* (2007).

Bien que les mécanismes associés à la tolérance et à la résistance chez les microorganismes soient complexes et divers dans la nature, ils peuvent être catégorisés de manière fonctionnelle (Figure I-14) (Lemire *et al.*, 2013) :

- La réduction de la capture des ETMs : la régulation, l'expression et l'activité des protéines impliquées dans l'entrée des ETMs dans la cellule sont fondamentales pour la résistance microbienne (Ma *et al.*, 2009).
- L'efflux : certains transporteurs transmembranaires sont capables de transporter spécifiquement les ETMs toxiques hors de la cellule, par l'hydrolyse de l'ATP (Silver and Phung, 1996; Nies, 1999; Ma *et al.*, 2009).
- La séquestration extracellulaire : certains microorganismes peuvent réguler l'expression de polymères extracellulaires ou de sidérophores en réponse à l'exposition aux ETMs. Ces molécules sont capables de piéger ou précipiter les ions

métalliques dans l'environnement extracellulaire ou à la surface des cellules (Harrison *et al.*, 2007).

- La séquestration intracellulaire : de nombreux microorganismes peuvent précipiter les métaux en oxydes métalliques ou en agrégats métal-protéine et les séquestrer ou les stocker dans le cytoplasme ou le périplasme.
- La réparation : les molécules cellulaires qui sont vulnérables à l'oxydation par les réactions primaires avec les ETMs toxiques ou par les ROS produits peuvent être réparées à l'aide de protéines chaperonnes, d'enzymes de réparation ou d'antioxydants (Harrison *et al.*, 2009).
- By-pass métabolique : les cellules peuvent contourner les voies métaboliques ayant des enzymes détruites par les métaux en produisant des protéines alternatives (Lemire *et al.*, 2013).
- La modification chimique : le métal toxique peut subir des réactions spécifiques qui altèrent sa réactivité chimique et le convertissent en une forme moins toxique ou moins biodisponible (Silver and Phung, 1996).

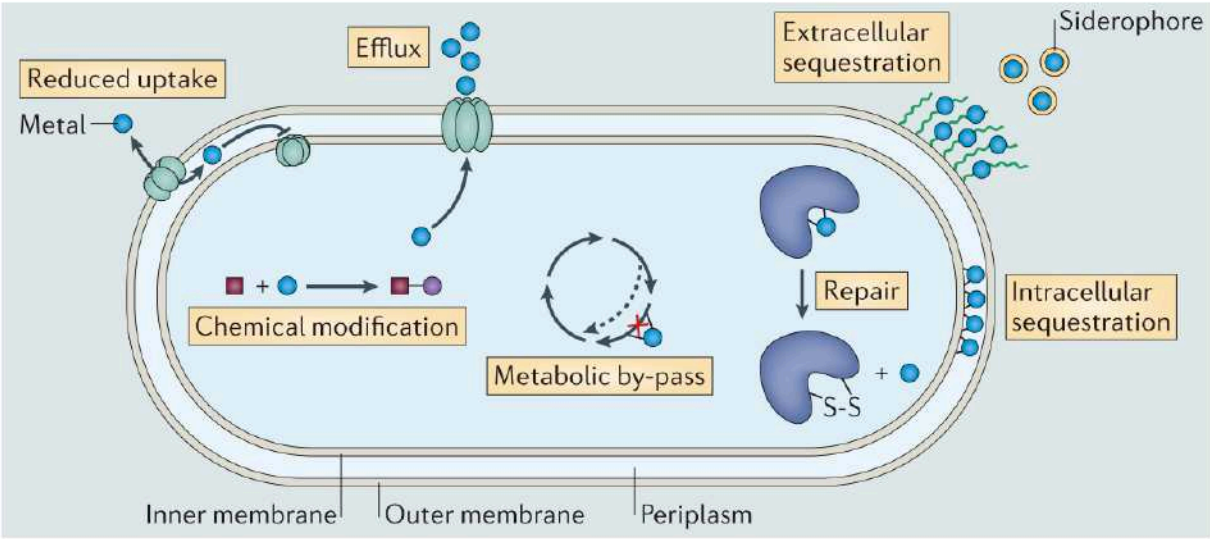


Figure I-14 Les mécanismes de résistance et d'adaptation aux métaux toxiques par les microorganismes (Lemire *et al.*, 2013).

Ces mécanismes de résistance aux ETMs toxiques sont pour la plupart partagés par les organismes unicellulaires planctoniques et les organismes formant des biofilms. Toutefois,

comme il a été montré sur Figure I-14, en plus de ces mécanismes, la formation d'un biofilm par des organismes unicellulaires peut être une stratégie très efficace pour survivre aux concentrations toxiques de ces composés métalliques (Harrison *et al.*, 2007). Il existe des preuves que les communautés microbiennes des biofilms développent une résistance et/ou une tolérance aux ETMs toxiques, souvent plus efficientes que celles des organismes planctoniques, par une combinaison d'actions chimiques, physiques, et physiologiques (Teitzel and Parsek, 2003; Harrison *et al.*, 2004a, 2004b). Ainsi, il n'existe pas moins de 7 mécanismes de résistance et/ou de tolérance contre une exposition aux ETMs toxiques spécifiques aux biofilms, décrits par Harrison *et al.* (2007) (Figure I-15) :

- L'hétérogénéité métabolique induite par la structure des biofilms (Walters III *et al.*, 2003; Borriello *et al.*, 2004): la présence de gradients métaboliques dans les biofilms conduit à différents états physiologiques des microorganismes selon les zones oxiques ou anoxiques. Les cellules proches du substrat (zones anoxiques) ont une croissance lente qui leur conférerait une tolérance intrinsèque élevée aux ETMs toxiques en comparaison aux cellules à croissance rapide des couches supérieures du biofilm (zone oxiques). Les cellules mortes peuvent également fournir des sites d'adsorption des ETMs, entraîner la formation de précipités métalliques et ainsi réduire la toxicité des métaux dans certaines zones de la structure tridimensionnelle du biofilm.
- La signalisation extracellulaire : le quorum sensing (QS) est un système de signal extracellulaire qui a probablement un rôle majeur dans la variation de tolérance des biofilms aux ETMs. Le QS pourrait être indirectement impliqué dans la protection des biofilms microbiens contre les ETMs toxiques en augmentant les niveaux de base d'enzymes telles que les superoxydes dismutases ou les catalases, responsables de la défense cellulaire contre le stress oxydatif (Hassett *et al.*, 1999; Geslin *et al.*, 2001). Comme il a été décrit dans la partie sur la formation des biofilms microbiens, le QS est un système de communication entre les cellules proches pour coordonner les comportements des populations ou réguler des gènes. Le QS bactérien est un système dépendant de la densité cellulaire, retrouvé chez tous les types d'organismes (planctoniques et agrégés) mais il est généralement mieux décrit dans les biofilms (Dobretsov *et al.*, 2009).
- L'immobilisation des ETMs par biosorption : Il a été estimé que la matrice extracellulaire et les éléments qui la composent ont 20 à 30 fois plus de sites de fixation

des ETMs que la surface des cellules (Liu and Fang, 2002). La matrice extracellulaire peut donc empêcher la diffusion des ions métalliques à travers le biofilm (Teitzel and Parsek, 2003; Harrison *et al.*, 2005, 2006). D'autres contributeurs comme les membranes cellulaires ainsi que les vésicules membranaires des biofilms sont responsables de la séquestration des ions métalliques, en offrant des sites d'accrochage supplémentaires (van Hullebusch *et al.*, 2003).

- Réactions bioinorganiques entre ions métalliques et métabolites : les métabolites produits par les microorganismes peuvent fixer ou réagir avec les ions métalliques, formant des complexes métalliques bioinorganiques. Un exemple bien connu est la formation d'un co-précipité entre les ETMs et les sulfures (S^{2-}) produits par des bactéries et archées sulfato-réductrices des biofilms (Beyenal and Lewandowski, 2004; Beyenal *et al.*, 2004). Enfin certains composés spécifiques aux biofilms comme les sidérophores sont produits afin d'améliorer les systèmes de transfert des métaux des cellules et ainsi augmenter les niveaux de résistance au Cu, notamment. Ces mécanismes ne sont pas spécifiques aux biofilms car ils sont retrouvés aussi chez les cellules planctoniques. Cependant, la concentration de ces composés est plus importante dans les biofilms que dans une cellule seule, ce qui fournit plus de temps aux cellules dans les biofilms pour s'adapter à une contamination.
- Réponses adaptatives aux ions métalliques : l'exposition d'un biofilm à certains ions métalliques peut changer les processus de différenciation cellulaire dans les biofilms. Les microorganismes dans les biofilms ont la capacité d'adapter leur physiologie pour survivre à des expositions spécifiques à des métaux toxiques (Harrison *et al.*, 2007). Ainsi, différents morphotypes sont observés dans les biofilms selon la nature et la force de la contamination. Cependant, les processus moléculaires responsables de ce changement de morphotype n'ont pas encore été élucidés.
- Cellules persistantes : les cellules persistantes sont 100 à 10 000 fois plus nombreuses dans les biofilms que dans les populations de cellules planctoniques (Spoering and Lewis, 2001). A l'échelle de la population, ces cellules sont responsables de l'augmentation de la tolérance vis-à-vis des ETMs (Harrison *et al.*, 2005). Au niveau moléculaire, ces cellules sont capables d'exprimer certains gènes associés à la tolérance au stress, tels que les protéines chaperonnes (Keren *et al.*, 2004) ou des modules chromosomiques toxine-antitoxine incluant l'opéron *hipBA*, qui code pour

une kinase toxique (HipA), et une protéine antitoxique de liaison à l'ADN (HipB), qui autorégule l'expression de *hipBA* (Lewis, 2007).

- Réarrangements génétiques, mutations et variations phénotypiques : il est souvent possible de rétablir une colonie à partir de cellules issues de colonies de variants morphologiques dans les biofilms, dont beaucoup présentent des traits phénotypiques modifiés par rapport aux communautés de départ (Boles *et al.*, 2004). La formation de variants peut être un facteur important dans la tolérance aux métaux toxiques car ces variants peuvent être des cellules mutantes ayant des gènes de résistance supplémentaires ou plus efficaces. Ainsi, ce mécanisme de résistance est basé sur l'hypothèse d'assurance (Boles *et al.*, 2004) : les mutations aléatoires ou les réarrangements génétiques produisent une diversité phénotypique qui favorise la survie des populations.

Bien que certains mécanismes de résistance et de tolérance soient similaires entre les communautés planctoniques et de biofilms, la présence de certains mécanismes exclusivement développés par les biofilms peut induire des différences de sensibilité et de réponse à l'échelle génétique, cellulaire et des populations. Lors d'une perturbation, ces différences peuvent être un des facteurs expliquant les variations de structure des communautés entre ces deux compartiments.

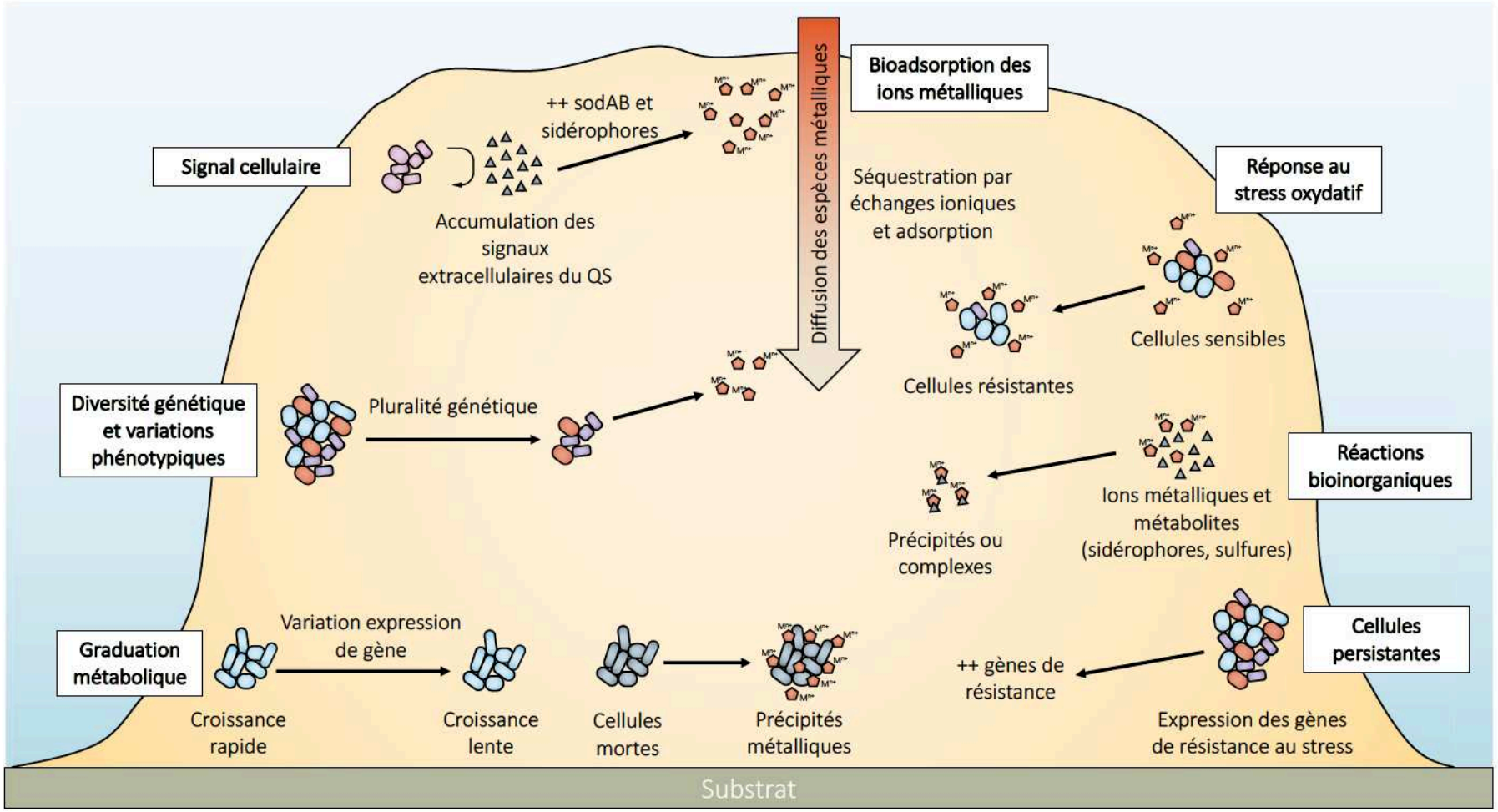


Figure I-15 Représentation schématique d'un modèle multifactoriel des mécanismes de résistance et de tolérance dans un biofilm. D'après Harrison *et al.* (2007).

I.3.3. Effets des ETMs sur les communautés microbiennes en milieu marin côtier

I.3.3.1. Principes fondamentaux d'écologie microbienne en lien avec une perturbation

Une perturbation peut se définir comme n'importe quel événement relativement discret dans le temps qui modifie les conditions environnementales initiales et naturelles de l'environnement, et qui peut perturber un écosystème, une communauté, ou la structure des populations (Picket and White, 1985). Les perturbations exercées peuvent être diverses, naturelles ou résultant de nombreuses activités anthropiques comme le dragage de sédiments, les pêcheries, l'aquaculture, le développement urbain, le transport maritime, le tourisme, les activités industrielles, agricoles et minières (Allison and Martiny, 2008; Halpern *et al.*, 2008; Baho *et al.*, 2012; Shade *et al.*, 2012). Toutes ces activités anthropiques sont généralement très développées dans les zones côtières, ce qui en fait des zones particulièrement sensibles, et où des gradients de contaminations multiples peuvent s'ajouter aux gradients des conditions environnementales naturelles. Enfin, deux types de perturbation peuvent être observées, quelle que soit la nature de la perturbation: une perturbation continue qui atteint un niveau constant et se maintient sur une longue période de temps, et une perturbation succincte, à court terme, souvent intense et qui diminue rapidement en intensité (Shade *et al.*, 2012).

La stabilité d'une communauté face à une perturbation dépend de sa résistance et de sa résilience, deux mesures quantifiables pour comparer les réponses des communautés face à une perturbation, en écologie microbienne (Allison and Martiny, 2008; Shade *et al.*, 2012). La résistance est définie comme le degré d'insensibilité d'une communauté face à une perturbation, en d'autres mots, une communauté est résistante si les changements de conditions environnementales ne modifient pas l'état original de la communauté. La résilience est définie comme le retour d'une communauté à une condition antérieure à la perturbation. La résilience d'une communauté dépend de ses capacités d'adaptation aux nouvelles conditions environnementales. Le retour des conditions environnementales à leur état initial dans l'écosystème peut aussi conduire à un retour des communautés à leur état initial. Enfin, le concept de sensibilité est l'inverse du concept de résistance et peut être défini comme le degré de changement d'une communauté suivant une perturbation (Pimm, 1984).

La stabilité d'une communauté peut être étudiée en termes de diversité (spécifique et fonctionnelle) et de composition. Ainsi, pour les fonctions présentes chez un grand nombre de taxa, la communauté va généralement avoir un degré élevé de redondance fonctionnelle et les changements de composition de cette communauté ne vont pas nécessairement correspondre aux changements fonctionnels (Allison and Martiny, 2008). Inversement, pour des fonctions très peu représentées, la sensibilité et la résilience de ces fonctions peuvent être étroitement liées aux changements de composition de la communauté. La redondance fonctionnelle est alors définie comme la capacité d'un taxon microbien à exécuter un processus (généralement une fonction) au même taux qu'un autre dans les mêmes conditions environnementales (Allison and Martiny, 2008). Ainsi le fonctionnement d'une communauté dans un écosystème perturbé ne sera pas altéré alors que sa composition a été modifiée.

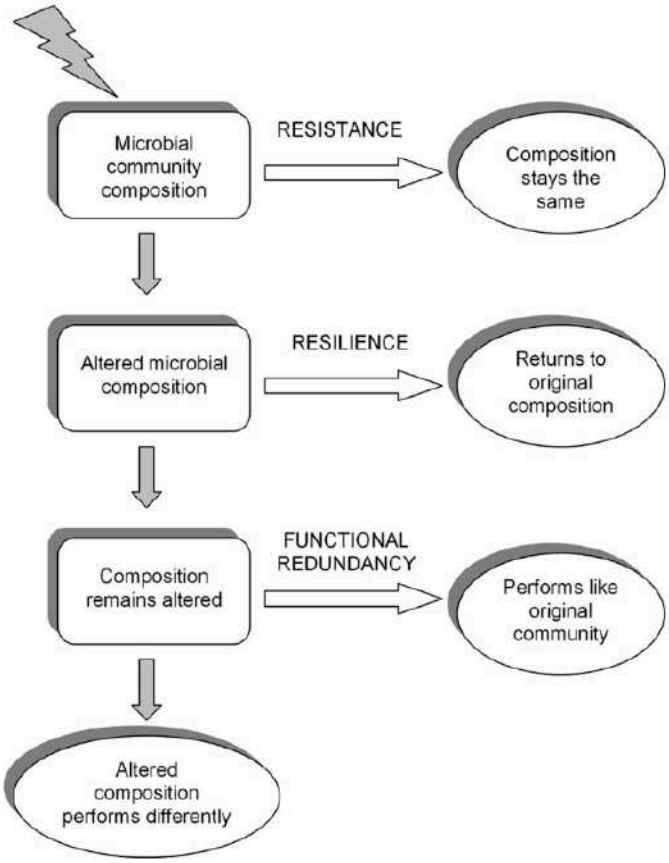


Figure I-16 Schéma des différents processus écologiques fondamentaux régissant la composition des communautés microbiennes en réponse à une perturbation (Allison and Martiny, 2008).

I.3.3.2. Diversité, turnover et relations entre les espèces

La réponse des communautés à une perturbation est un sujet central des études d'écologie microbienne. Plus spécifiquement, ces études proposent de comprendre comment les perturbations d'un écosystème influencent la diversité, la structure, les fonctions et les relations entre les espèces dans une communauté microbienne.

I.3.3.2.1. La diversité sous toutes ses formes

Dans ce sens, l'hypothèse de perturbation intermédiaire (IDH pour « intermediate disturbance hypothesis ») suggère que les relations entre diversité et perturbations peuvent être représentées graphiquement comme une distribution unimodale (Connell, 1978). Ainsi, la diversité d'une communauté est faible quand les niveaux de perturbations sont faibles et elle augmente avec la fréquence et la force des perturbations. Passé un seuil de fréquence et/ou intensité, la diversité de la communauté diminue à nouveau. Cette hypothèse a été vérifiée chez plusieurs communautés microbiennes originaires des sols (Griffiths and Philippot, 2013; Degrune *et al.*, 2017), des sédiments marins (Galand *et al.*, 2016; Misson *et al.*, 2016), des rivières (Berga *et al.*, 2012) et des biofilms marins (McElroy *et al.*, 2016).

Une autre hypothèse suggère que la relation positive entre diversité taxonomique et résilience est due à un effet tampon, appelé hypothèse d'assurance (« the insurance hypothesis ») (Yachi and Loreau, 1999). Les communautés génétiquement plus diversifiées (*i.e.* plus d'espèces) sont plus susceptibles de contenir des taxa ayant des réponses aux perturbations complémentaires (Elmqvist *et al.*, 2003) et de posséder la capacité de croître rapidement après une perturbation (Wittebolle *et al.*, 2009; Flöder *et al.*, 2010), ce qui peut conduire à la résilience de la communauté. Griffiths and Philippot (2013) ont montré que les communautés avec une faible diversité étaient moins résistantes fonctionnellement (perte de certaines fonctions) à une perturbation et étaient incapables de se rétablir. Une expérience en mésocosmes a été réalisé afin d'examiner spécifiquement le rôle de la diversité initiale sur la stabilité fonctionnelle d'une communauté soumise à une augmentation de salinité et de température (Wittebolle *et al.*, 2009). L'étude a montré qu'une grande diversité initiale était importante pour la stabilité fonctionnelle des communautés microbiennes. Ce travail a aussi démontré que des aspects autres que la diversité des espèces comme la structure des

communautés, notamment le grand nombre de taxons rares (parfois appelé « biosphère rare ») peuvent jouer un rôle dans la stabilité fonctionnelle de la communauté. Les taxa considérés comme rares (généralement moins de 1% de la communauté globale) (Sogin *et al.*, 2006) peuvent aussi avoir la capacité à répondre rapidement à une perturbation et devenir abondants (Caporaso *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012). Le pool de taxa rares dans une communauté peut être très abondant (Sogin *et al.*, 2006; Alonso-Sáez *et al.*, 2015) et ils peuvent réellement représenter un réservoir d'adaptation et un potentiel de résilience. Prises ensembles, ces études montrent les relations complexes entre diversité des communautés microbiennes, fonction et stabilité. Les multiples aspects de la diversité peuvent influencer la résilience et la résistance des communautés mais aussi la réponse fonctionnelle des communautés face à une perturbation. Toutefois, la diversité ne suffit pas à expliquer à elle seule ces différences de réponses et il apparaît nécessaire de prendre en compte la composition des communautés microbiennes pour améliorer la compréhension de ces processus (Banks *et al.*, 2013).

I.3.3.2.2. Changement de composition : le turnover

Historiquement, le changement de composition était défini comme le remplacement et la substitution des membres d'une communauté le long d'un gradient environnemental (Wilson and Shmida, 1984). Avec le développement des nouvelles techniques moléculaires de séquençage et de nos capacités à détecter des espèces rares, le turnover peut être défini comme un changement de l'abondance relative des différents taxa qui composent la communauté microbienne. Ce changement d'abondance relative est directement affecté par la croissance et la mortalité des différents taxa qui composent la communauté lors d'une perturbation.

I.3.3.2.3. Importance des interactions entre microorganismes

Avec la diversité et la composition des communautés microbiennes, l'importance des interactions entre les organismes d'une même communauté pour la stabilité de l'écosystème a depuis longtemps été étudiée en écologie à l'aide d'analyses en réseaux (Pimm, 1984; Montoya *et al.*, 2006; Fuhrman and Steele, 2008). L'existence de groupes d'espèces dans une

communauté qui interagissent entre eux augmente significativement la résistance et la résilience de la communauté contre une perturbation et donc la stabilité car ces groupes agissent comme des tampons aux développements ou aux extinctions des espèces (Stouffer and Bascompte, 2011). De manière générale, une communauté où les interactions seraient faibles entre les microorganismes serait moins stable et plus sensible face à une perturbation (Griffiths and Philippot, 2013). Toutefois, des études en mésocosmes ont aussi montré que des interactions de type compétition agissaient de façon synergique avec une perturbation (ultrasons) et entraînaient une augmentation de la mortalité (Violle *et al.*, 2010).

Bien que ces concepts et hypothèses soient bien décrits, la plupart des études essayant de comprendre l'influence d'une perturbation sur les communautés microbiennes a été réalisée sur des communautés associées aux sols et aux sédiments (Griffiths and Philippot, 2013). Dans le milieu marin, les perturbations sont souvent associées à un changement des conditions environnementales dites classiques comme une augmentation de température, de disponibilité en nutriments ou un changement abrupt de salinité par exemple (Bouvier and del Giorgio, 2002; Crump *et al.*, 2004; Fortunato *et al.*, 2011). Relativement peu d'études ont observé les effets d'une perturbation métallique sur la diversité et la structure des communautés microbiennes planctoniques ou de biofilm en milieux côtier. Les études de co-occurrence des communautés microbiennes en milieu marin sont aussi nombreuses (Fuhrman and Steele, 2008; Eiler *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Berdjeb *et al.*, 2018) mais très peu prennent en compte ces interactions interspécifiques pour comprendre l'impact d'une perturbation notamment métallique sur les communautés microbiennes (Pollet *et al.*, 2018; Catão *et al. Submitted*). Enfin, il n'existe que très peu d'études sur les communautés microbiennes associées au biofilm en relation avec les ETMs dans les écosystèmes côtiers (Briand *et al.*, 2012, 2017; McElroy *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2018; Corcoll *et al.*, 2019; Catão *et al. Submitted*). Les études de terrain ou expérimentales étudiant l'impact spécifique d'une perturbation métallique sur des communautés microbiennes planctoniques et de biofilm en milieu marin côtier et utilisant des techniques d'analyses moléculaires sont référencées dans le tableau 1 et décrites dans la sous-partie suivante.

Tableau I-1 Résumé des études de terrain ou expérimentales étudiant l'impact d'une perturbation métallique sur des communautés microbiennes (bactérioplancton et biofilm autotrophe et hétérotrophe) en milieu marin côtier et utilisant des techniques d'analyses moléculaires (n = 18).

Auteur et année	Journal	Location	Compartiment biologique	Type de contamination	Outils d'analyse étudiés	Approches
Briand et al., 2012	Biofouling	Toulon et Porquerolles, France	Picoplancton procaryote et eucaryote	ETM	DGGE	Terrain
Briand et al., 2017	Microbial Ecology	Toulon et Lorient, France	Biofilm procaryote	ETM	Séquençage	Terrain
Caroppo et al., 2006	Environmental Toxicology	Bosco Marziotta, Mer Ionienne	Picoplancton procaryote	ETM et PCB	Microscopie	Microcosme
Celikkol-aydin et al., 2016	Marine Environmental Research	Golfe de guinée	Bactérioplancton et biofilm procaryote	Hydrocarbures	Séquençage	Terrain
Corcoll et al., 2019	Frontiers in Microbiology	Fjord Gullmar, Suède	Biofilm procaryote et eucaryote	Cuivre	Séquençage	Microcosme
Goni-Urriza et al., 2018	Chemosphere	Baie de Bizerte, Tunisie	Bactérioplancton et phytoplancton	ETM et pesticides	Séquençage	Microcosme
Henríquez-Castillo et al., 2015	Phycological Research	Aire de Chañaral, Chilie	Phytoplancton	Cuivre	T-RFLP	Microcosme
Hentati	Thèse	Sfax, Tunisie	Bactérioplancton et biofilm procaryote	Hydrocarbures	Séquençage	Mésocosme
Sauret et al., 2015	Environmental Science and Pollution Research	Marseille, France	Bactérioplancton	Hydrocarbures	Séquençage Sanger	Terrain
Morán et al., 2008	Environmental Toxicology and Chemistry	Aire de Chañaral, Chilie	Bactérioplancton	Cuivre	T-RFLP	Terrain
Meng et al., 2015	Geophysical Research Letters	East China Sea	Phytoplancton	Aérosols	Clonage et séquençage	Terrain
Meng et al., 2016	Geophysical Research Letters	East China Sea	Phytoplancton	Aérosols	Clonage et séquençage	Mésocosme
Pollet et al., 2018	FEMS Microbiology Ecology	Toulon, France	Biofilm procaryote	ETM	Séquençage	Terrain
Qian et al., 2017	Environmental Pollution	Xiangshan Bay, East China Sea	Bactérioplancton	Cadmium et phénanthrène	Pyroséquençage	Microcosme
Salerno et al., 2018	Frontiers in Marine Science	Golfe du Mexique	Bactérioplancton et biofilm procaryote	Pétrole	Séquençage et métagéomique	Microcosme
Wang et al., 2015	Applied and Envioronmental Microbiology	Xiangshan Bay, East China Sea	Bactérioplancton	Cadmium	Pyroséquençage	Microcosme
Winfield et al., 2018	Biofouling	Hartlepool Marina, Royaume-Uni	Biofilm procaryote	Cuivre	Séquençage	Terrain
Yang et al., 2016	Scientific Reports	Gouqi Island, Chine	Biofilm procaryote et diatomées	Nanoparticules d'argent	Séquençage	Terrain
Yoshida et al., 2006	Marine Pollution Bulletin	Baie de Tokyo, Japon	Bactérioplancton	Pétrole	DGGE	Mesocosm
Zouch et al., 2018	Frontiers in Microbiology	Sfax, Tunisie	Bactérioplancton	ETM	Séquençage	Mesocosm

I.3.3.3. Effets des ETMs sur les communautés microbiennes

Mettre en évidence les effets spécifiques d'une perturbation métallique sur les communautés microbiennes par des études de terrain est complexe car plusieurs contaminants peuvent coexister dans un écosystème côtier, co-varier et/ou interagir avec d'autres changements environnementaux plus classiques (Nogales *et al.*, 2011). Il existe très peu d'information sur comment les contaminants métalliques affectent les communautés microbiennes planctoniques et de biofilm dans les écosystèmes côtiers (Tableau I-1).

La pression anthropique et la contamination en ETMs créent des caractéristiques propres aux zones côtières auxquelles les communautés microbiennes peuvent répondre. Ainsi, bien qu'il existe des caractéristiques intrinsèques à chaque écosystème côtier, un ensemble de caractéristiques communes semblent définir ces zones. En général, la diversité microbienne dans les écosystèmes contaminés en ETMs, côtiers ou pas, est plus élevée que dans les écosystèmes non contaminés (Zhang *et al.*, 2007, 2009; Nogales *et al.*, 2011). De plus, la forte hétérogénéité spatiale des contaminants dans ces zones contribue à créer des micro-niches aux caractéristiques très variables qui favorisent les variations de diversité et de composition des communautés microbiennes au sein d'un même écosystème (Sauret *et al.*, 2015). Le Cu qui est l'un des ETMs les plus étudiés dans les sols, a été montré pour altérer la composition des communautés microbiennes avec des effets particulièrement néfastes pour les Acidobacteria et positifs pour les Actinobacteria (Griffiths and Philippot, 2013; Kou *et al.*, 2018). Ruyters *et al.* (2010) ont conclu qu'après 1 à 2 ans d'exposition des sols au Zn, l'adaptation des communautés aux ETMs résultait d'un changement de composition où les bactéries oxydant l'ammonium étaient devenues majoritaires dans la communauté. Ce résultat montre qu'une contamination en ETMs peut induire un changement d'activité et des fonctions des communautés microbiennes dans un écosystème contaminé. Ce changement de composition est généralement graduel (Sauret *et al.*, 2015). Il semble qu'une large variété de genres appartenant aux Gammaproteobacteria (*Alteromonas, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Colwellia, Glaciecola et Vibrio*) et divers membres de la familles des Flavobacteriaceae et des Roseobacter (Kan *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007, 2009; Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017) soient abondants dans les zones côtières contaminées. Enfin, les fonctions des communautés microbiennes peuvent aussi être altérées par la contamination en ETM. Plusieurs études ont montré que dans des écosystèmes contaminés, les capacités

métaboliques des communautés dans les sédiments ou dans d'anciennes mines pouvaient être modifiées au même titre que la composition des communautés (Chen *et al.*, 2013; Jeanbille *et al.*, 2016; Ni *et al.*, 2016). Toutefois, à notre connaissance aucune étude de l'impact d'une contamination métallique sur les fonctions des communautés planctoniques en milieu côtier n'a été réalisée. Cette thèse apportera des connaissances nouvelles sur les réponses fonctionnelles des communautés microbiennes en lien avec une contamination métallique par l'utilisation d'outils bioinformatiques de prédiction fonctionnelle.

Historiquement, l'étude de l'impact des perturbations par les contaminants sur les biofilms microbiens marins a majoritairement été focalisée sur l'impact de peintures antifouling contenant et libérant des biocides (Briand *et al.*, 2012, 2017; C. Chen *et al.*, 2013; Camps *et al.*, 2014; Winfield *et al.*, 2018). Récemment, quelques études ont proposé d'étudier l'impact d'une contamination métallique dans la colonne d'eau environnante sur les biofilms microbiens (Briand *et al.*, 2017; Pollet *et al.*, 2018; Corcoll *et al.*, 2019). Il existe toutefois un manque cruel de comparaison entre des biofilms naturels se développant dans des sites dits pristines et des sites très contaminés. De plus, souvent les gradients de contamination en ETMs sont associés à des variations d'autres paramètres environnementaux, rendant l'interprétation de l'effet d'une contamination sur les communautés difficiles (Briand *et al.*, 2017). En utilisant une approche PICT et en caractérisant la composition des communautés de biofilm soumis à différentes concentrations de Cu, Corcoll *et al.* (2019) ont montré qu'à partir de 60 nM de Cu, la composition des communautés microbiennes était altérée et qu'une exposition au Cu pouvait sélectionner une communauté plus résistante à de futures contaminations. Briand *et al.* (2017) ont quant à eux aussi montré que les gradients de contamination en ETMs dans la rade de Toulon avaient une influence sur la composition des communautés des biofilms microbiens sans pouvoir toutefois évaluer la part réelle de cette influence par rapport aux autres variables environnementales du milieu.

Il existe trop peu d'études qui mettent en relation une contamination métallique et les communautés microbiennes en biofilm pour identifier clairement et généraliser sur des groupes taxonomiques potentiellement résistant ou sensible aux ETMs. Ainsi, il reste encore aujourd'hui très difficile de comparer les réponses des communautés planctoniques et en biofilm face à une contamination métallique. De plus, le biofilm est un compartiment sessile exposé aux courants marins alors que les organismes planctoniques sont transportés par ces mêmes courants et donc soumis à d'autres variations environnementales que le biofilm. Cette

distinction écologique entre ces deux modes de vie rend cette comparaison encore plus difficile.

Bien que la protection des zones côtières soit un enjeu majeur actuel, le manque de connaissance relative à l'impact d'une contamination métallique sur les communautés microbiennes planctoniques et en biofilm en milieu marin côtier est encore très important aujourd'hui. Ainsi ce travail de thèse permettra d'apporter des informations complémentaires aux études précédentes afin de mieux comprendre les relations entre les ETMs et les communautés microbiennes, et d'identifier les différences de réponse selon le compartiment (planctonique vs biofilm).

I.4. Contexte géographique de l'étude : zone côtière méditerranéenne, la rade de Toulon

Cette quatrième partie est consacrée à la description du contexte de la zone d'étude. Dans un premier temps, une présentation de la mer Méditerranée, dans laquelle la zone d'étude se situe, sera réalisée. Ensuite une description des caractéristiques de la rade de Toulon et des activités présentes sera proposée.

I.4.1. La Mer Méditerranée

La mer Méditerranée a une surface de 3,5 x 10^6 km^2, ce qui représente 1% du volume d'eau océanique mondial. La longueur du bassin le long de l'axe Est-Ouest est de 4000 km et les côtes représentent 46 000 km. La Méditerranée est divisée en 2 bassins principaux (le bassin occidental à l'est et le bassin oriental à l'ouest). La mer Méditerranée est connectée à l'Océan Atlantique par le détroit de Gibraltar, à la Mer Noire par le détroit des Dardanelles et à la Mer Rouge par le canal de Suez. Les principaux rivières et fleuves sont le Rhône en France, le Pô en Italie, le Nil en Égypte et l'Èbre en Espagne.

Malgré la présence de nombreux fleuves l'alimentant en eau douce, la Méditerranée est un bassin d'évaporation, avec une balance hydrique négative avec l'océan Atlantique. En été, les eaux de surface de la Méditerranée sont caractérisées par une thermocline dont la profondeur et le gradient de température augmente lentement d'Ouest en Est. Les eaux

profondes de la Méditerranée sont très homogènes, avec une température d'environ 12.8°C toute l'année et une salinité d'environ 38.2. Enfin, la durée de résidence des eaux dans le bassin occidental a récemment été estimée à 50 ans (Pinot, and Ganachaud, 1999).

La mer Méditerranée est considérée comme un « hot spot » de biodiversité et abrite 7 et 18% de la faune et de la flore mondiale, respectivement (Myers *et al.*, 2002). L'écosystème côtier le plus typique de Méditerranée est représenté par les herbiers de posidonies, suivi par l'écosystème coralligène formé d'algues rouges calcaires. Enfin, on considère que la biodiversité est plus élevée dans le bassin occidental que dans le bassin oriental, pourtant soumis à d'importantes activités humaines et pressions (Bianchi and Morri, 2000).

Le point de départ de toutes les activités et pressions anthropiques en Méditerranée est l'augmentation de la population, notamment dans les zones côtières où le développement urbain et le tourisme sont très importants. Les interactions entre le tourisme et l'environnement sont nombreuses : utilisation de l'espace, consommation des ressources en eaux, pollution et accumulation de déchets. Le rejet des déchets dans la mer provoque le plus souvent la dégradation des écosystèmes marins, due à l'augmentation des nutriments et des contaminants organiques et inorganiques potentiellement toxiques pour les organismes, et à la dispersion des bactéries pathogènes. De manière plus générale, un ensemble d'activités et de pressions anthropiques tels que les rejets urbains, les décharges par les fleuves et les sédiments, les eaux de ruissellement issues de l'agriculture, les pêcheries, l'aquaculture, les activités industrielles, le trafic maritime, et l'exploitation des ressources des sols marins contribuent à l'augmentation et l'accumulation des contaminants en Méditerranée et principalement dans les zones côtières, qui sont considérées comme des « hot spots » de contamination (Laubier, 2005).

I.4.2. La rade de Toulon

I.4.2.1. Caractéristiques géographiques, climatiques et hydrodynamiques

La zone d'étude de ce travail de thèse est concentrée dans la rade de Toulon, située dans le bassin Nord-Ouest de la mer Méditerranée et dans le Sud-Est de la France (Figure I-17). La rade de Toulon est divisée en deux sous-parties par une digue : la petite rade (PR) et la grande rade (GR). La PR, semi-fermée, a une superficie de ~9.8 km² et une profondeur moyenne de

12 m. La PR est connectée à la GR par deux passes au Nord et au Sud de la digue, la passe Sud étant la plus large et profonde et celle par laquelle passent tous les grands bateaux. La GR est largement ouverte sur le large, présente une superficie de 42 km² avec une bathymétrie croissante vers le large, pour atteindre une profondeur maximale d'environ 50 m.

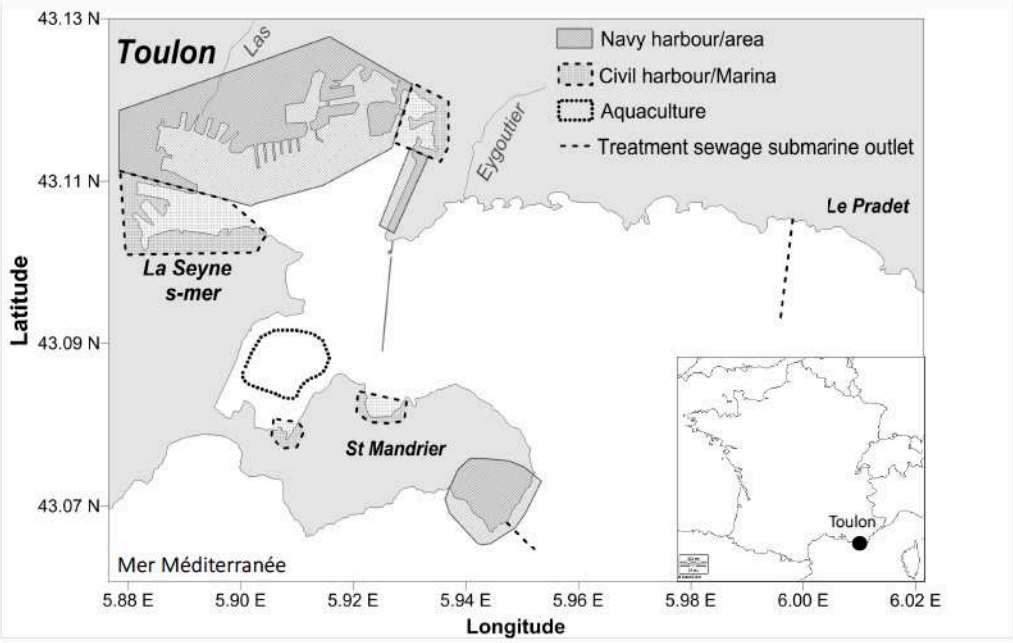


Figure I-17 Carte de la zone d'étude : la rade de Toulon.

Le climat de la rade de Toulon est de type Méditerranéen avec des hivers doux, des étés chauds, un fort ensoleillement et des pluies saisonnières, comprises généralement entre septembre et janvier. Ces pluies de courte durée mais de forte intensité sont responsables du lessivage des différents bassins versants et du drainage vers la mer des particules d'origines naturelle comme anthropique (Elbaz-Poulichet, 2005; Oursel *et al.*, 2013). La région de Toulon est soumise à deux régimes de vents principaux : le Mistral (un tiers du temps) et le vent d'Est (un tiers du temps). Le dernier tiers regroupe les période de temps calme (Millot, 1990). Le Mistral est un vent sec et froid venant du Nord. En été, le Mistral souffle en moyenne à 10-15 $m.s^{-1}$ pendant 1 à 3 jours (Millot, 1990). En hiver, son intensité peut être beaucoup plus forte et il peut souffler sur des épisodes plus longs (1 à 2 semaines). Le vent d'Est, chaud et humide, souffle très fort de l'automne au printemps. Moins fréquent que le Mistral, ses rafales peuvent

atteindre jusqu'à 26 $m.s^{-1}$ (Millot, 1990). Ces vents ont une influence importante sur l'hydrodynamique dans la rade de Toulon.

De manière simplifiée, la circulation de l'eau dans la rade de Toulon est principalement contrôlée par le vent, ce qui provoque des variations temporelles des courants de la colonne d'eau, notamment lorsque le vent change de sens (Dufresne *et al.*, 2014). Lors de fort Mistral, la couche de surface est chassée vers le large tandis qu'un apport d'eau froide s'opère par le fond (upwelling), avec une remontée des eaux sur la côte au nord de la PR. Inversement, par vent d'Est, un phénomène de downwelling se met en place : le vent venant du large apporte des eaux en surface, celles-ci plongent à la rencontre de la côte. Un vent d'Est engendre aussi une houle qui augmente la hauteur des vagues. Les courants de la PR ont une influence plus faible que ceux de la GR et ils s'écoulent le long du chenal entre la PR et la GR. Dans ce chenal, la couche de surface est entraînée par le vent et un flux opposé circule au niveau du fond (Dufresne *et al.*, 2014). La circulation des masses d'eau influence le temps de résidence, qui correspond au temps de renouvellement de toute l'eau d'une zone. Dufresne *et al.* (2014) proposent une évaluation de ce temps de résidence dans la PR en se basant sur le flux à la sortie de celle-ci : 3.4 jours en moyenne, au plus bas 1.5 jours en conditions de vent fort et jusqu'à 7.5 jours par temps calme.

Les apports en eau douce de la PR se limitent à un fleuve côtier, le Las, de faible débit (10 $m^3.h^{-1}$ en moyenne) et au ruissellement des eaux de pluie sur le bassin versant de l'agglomération toulonnaise. L'Eygoutier est le seul fleuve se déversant dans la GR et qui présente un régime de base constitué de faibles débits, similaires à ceux du Las (10 $m^3.h^{-1}$ en moyenne) (Nicolau, 2011).

I.4.2.2. Contexte socio-économique et présentation des activités majeures dans la rade de Toulon

La ville de Toulon se situe dans le Sud-Est de la France, dans la région Sud Provence-Alpes-Côte-D'azur entre deux grandes métropoles : Marseille et Nice. L'agglomération toulonnaise est une zone urbaine ainsi que le siège d'activités industrielles, commerciales, touristiques, militaires et aquacoles. Toulon et son agglomération comptent actuellement 431738 habitants (INSEE, 2016). La majeure partie des activités concernant la rade de Toulon se concentrent dans la PR. Toulon est le premier port militaire français, où siège 60% de la flotte

militaire de la Marine Nationale (6 sous-marins nucléaires, 37 bâtiments de guerre dont le porte-avion Charles de Gaulle). Il emploie actuellement plus de 20000 militaires et 10000 civils. Le port de plaisance de Toulon a accueilli, en 2017, 1,7 millions de passagers, 1480 escales, notamment de ferries et transporté 143 kilotonnes de frets (CCI Var, 2017). Les 5 ports de plaisance (Toulon - vieille darse, Toulon - Mourillon, Saint-Mandrier, La Seyne-Sur-Mer et le port des Oursinières) peuvent accueillir 2480 bateaux. Les activités d'aquaculture sont concentrées dans la baie du Lazaret, située dans le sud de la PR. Les activités de conchyliculture s'étendent sur 10 hectares et produisent 200 tonnes de coquillages (moules et huitres) chaque année. En parallèle, 200 tonnes de loups et daurades royales sont produits par les activités piscicoles. La GR est essentiellement soumise aux activités touristiques, avec de nombreuses plages, bases de loisirs et le port du Mourillon et des Oursinières. Ainsi, la rade de Toulon est le siège d'une activité anthropique intense, qui en plus du passif militaire fort de la rade (sabordage de la flotte militaire française lors de la seconde Guerre Mondiale), entraîne une contamination des sédiments et de la colonne d'eau importante.

I.4.2.3. État des connaissances sur la contamination de la rade de Toulon

Plusieurs études font référence à une contamination multiple de la rade de Toulon par de multiples composés métalliques, organométalliques et organiques dans les sédiments et la colonne d'eau.

La contamination des sédiments de la rade de Toulon est bien décrite. Les concentrations en Cu, Pb et Zn ont révélé une très forte contamination des sédiments du nord de la PR, en particulier dans les zones les plus enclavées où sont concentrées les activités anthropiques et où le renouvellement des masses d'eau est le plus faible (Tessier *et al.*, 2011; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Misson *et al.*, 2016). Les sédiments du nord de la PR présentent une contamination en Pb très importante du fait des évènements historiques liés à la seconde guerre mondiale et au sabordage de la flotte française en 1942 (Tessier *et al.*, 2011; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). En plus du Pb, les concentrations en Hg piégées dans les sédiments de surface (0-5 cm) présentent le gradient le plus important entre la GR et le nord de la PR, avec des concentrations en Hg près de 1000 fois plus élevées dans les sédiments les plus contaminés (Tessier *et al.*, 2011; Daniel Cossa *et al.*, 2014). Les sédiments de la grande rade, ouverte vers le large, sont apparus moins contaminés en Cu, Pb et Zn. La PR montre aussi une

contamination en composés organométalliques, en particulier en Tributyl Tin (TBT) et des produits issus de leur dégradation (DBT et MBT), dont l'origine serait principalement due à l'utilisation de peinture antifouling (Pougnet *et al.*, 2014; Misson *et al.*, 2016). Le gradient de contamination des sédiments en composés organométalliques reprend celui déjà décrit pour les ETMs, avec une contamination maximale au niveau des chantiers navals et des concentrations relativement faibles retrouvées à la sortie de la GR. Enfin, d'autres composés organiques comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB) sont présents dans les sédiments de la rade de Toulon (Misson *et al.*, 2016; Wafo *et al.*, 2016; Guigue *et al.*, 2017).

La remise en suspension des sédiments constitue le premier vecteur de transfert des contaminants vers la colonne d'eau de la rade de Toulon, amplifiant la contamination en ETMs dans l'eau (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). Par exemple, la source majeure de Pb dans la colonne d'eau de la rade de Toulon provient principalement des sédiments contaminés du nord de la PR (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). Bien que le Pb soit un des ETMs montrant un gradient de contamination très important entre la GR et la PR, d'autres éléments comme le Cd, le Cu et le Zn montrent des gradients le long de la rade de Toulon (Rossi and Jamet, 2008; Jean *et al.*, 2012). L'accumulation de ces ETMs dans la colonne d'eau de la rade de Toulon est principalement le fait des activités nautiques et militaires. Toutefois, en comparaison des nombreuses études sur le compartiment sédimentaire, seulement 3 études font état d'une contamination multi-élémentaire de la colonne d'eau de la rade de Toulon. Il est apparu nécessaire d'enrichir les observations géochimiques sur ce site d'étude afin de mieux comprendre les transferts de contaminants entre les sédiments et la colonne d'eau et de mieux caractériser les variations spatio-temporelles des concentrations en ETMs dans la rade de Toulon.

La rade de Toulon apparaît alors comme une formidable zone d'étude dans le sens où elle présente des gradients de contamination multiple dans les sédiments et dans la colonne d'eau, permettant une meilleure compréhension de l'impact des ETMs sur la diversité et la composition des communautés microbiennes dans les zones côtières fortement anthropisées.

I.4.3. Programme de recherche

Dans ce contexte, ce travail de thèse porte sur l'étude des « Impacts d'une multicontamination en éléments traces métalliques sur les communautés microbiennes dans un environnement côtier fortement anthropisé : la rade de Toulon. ». Ce travail s'inscrit dans le cadre de différents projets : PREVENT, METOPHYTO et IMPRECI-M^2.

Le projet PREVENT pour "PRotection du littoral méditerranéen : ÉValuation, surveillancE, conséqueNces, impacT économique et sociétal – Application à la Rade de Toulon" (2015-2018) était un projet multidisciplinaire impliquant plusieurs laboratoires de l'Université de Toulon (Figure I-18) et financé par celle-ci. Le projet visait à mieux évaluer l'impact de l'anthropisation que subissent les zones côtières, notamment en Mer Méditerranée. Fédérant un grand nombre de disciplines scientifiques, l'objectif était d'appréhender les différentes facettes de cette problématique, en se focalisant sur un site atelier représentatif : la Rade de Toulon. Les objectifs principaux du projet PREVENT consistaient à développer des outils pertinents permettant de mieux appréhender les interrelations complexes entre anthropisation des zones côtières (ex. qualité du milieu) d'une part, et d'autre part les activités économiques et sociétales. L'étude menée durant ma thèse a fait partie de l'action 3 : Conséquences. L'objectif de l'action 3 du projet PREVENT visait à étudier l'impact réciproque entre des polluants (métaux et métalloïdes) particulièrement préoccupants dans la Rade de Toulon et des micro-organismes (bactéries, archées, eucaryotes autotrophes) essentiels au fonctionnement de l'écosystème et participant au transfert de ces polluants dans 3 compartiments environnementaux (sédiment, eau et biofilms).

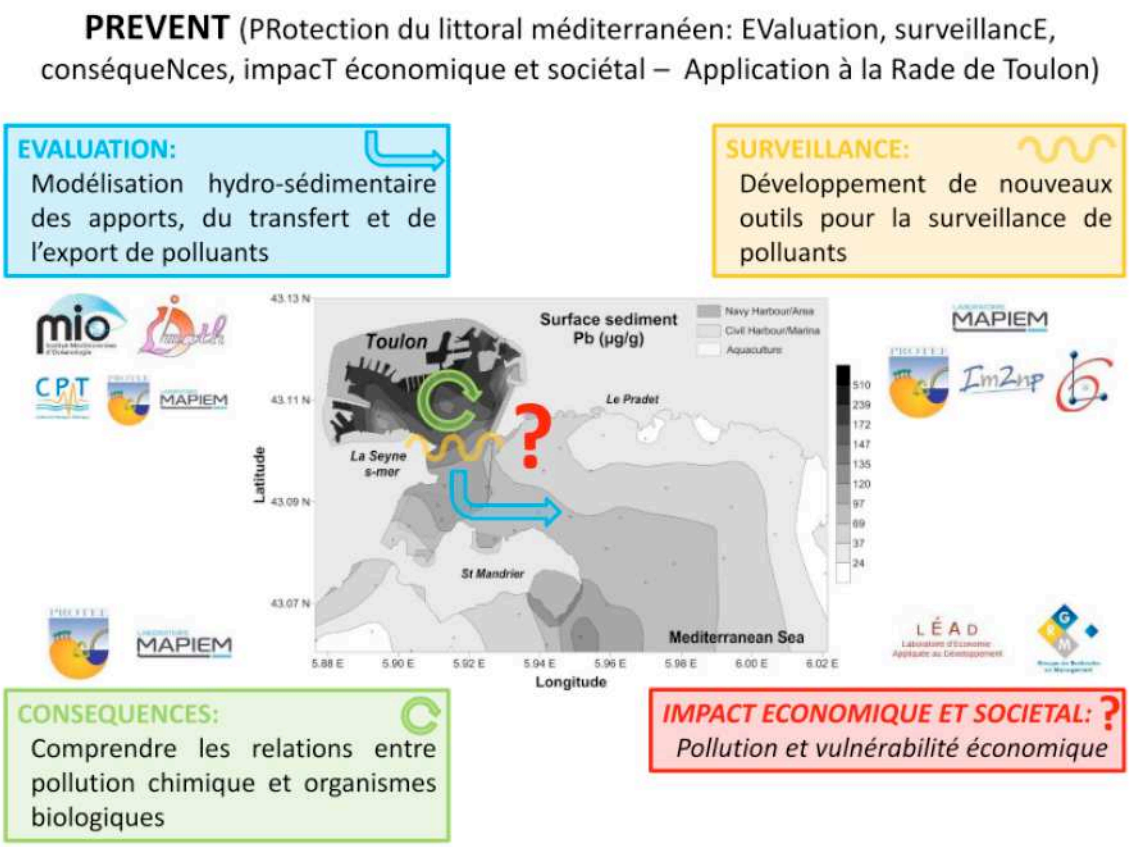


Figure I-18 Présentation des quatre axes du projet PREVENT et des laboratoires associés.

Le projet METOPHYTO pour « Influence de pollutions MEtalliques multiples représentatives de l'environnement marin côtier TOulonnais sur le picoPHYTOplancton » (financé par FR ECCOREV, 2015-2016) était un programme multidisciplinaire (chimie de l'environnement, écologie moléculaire, écotoxicologie, biologie cellulaire) afin de permettre une caractérisation écotoxicologique la plus complète possible d'une communauté biologique naturelle complexe. Il avait pour but d'analyser les variations temporelles qualitatives et quantitatives de l'ultraphytoplancton marin de la rade de Toulon exposé en conditions contrôlées à des cocktails de polluants chimiques représentatifs de l'environnement.

Enfin le projet IMPRECI-M^2 pour « Impacts réciproques entre microorganismes et métaux traces en milieu marin côtier : qui contrôle qui ? » (financé par EC2CO, 2016-2018) proposait une approche pluridisciplinaire et expérimentale en conditions contrôlées pour étudier plus finement les impacts réciproques entre microorganismes et contaminants métalliques tels que rencontrés dans un milieu marin côtier. Ainsi, ce projet s'articulait autour de 3 questions scientifiques :

- Quels sont les impacts d'une contamination du milieu marin par des éléments traces métalliques (ETM) potentiellement toxiques (Cu, Pb, Zn), à des niveaux de concentrations similaires à ceux observées dans la rade de Toulon, sur la diversité et les fonctions des communautés microbiennes hétérotrophes (bactéries, archées) et autotrophes (cyanobactéries, pico- et nanoeucaryotes photosynthétiques) vivant libres dans la colonne d'eau et en biofilm ?
- Comment la spéciation, la disponibilité et le transfert entre les compartiments dissous et particulaires des contaminants trace métalliques sont-ils influencés par les communautés microbiennes ?
- Comment ces influences réciproques entre microorganismes et ETM varient-elles en fonction du passif d'exposition des communautés microbiennes naturelles ?

Ce projet a participé à un effort de structuration des recherches sur les thématiques d'écotoxicologie microbienne et de biogéochimie, autour d'un site atelier caractéristique d'une zone côtière sous forte pression anthropique, la rade de Toulon. La confrontation des résultats obtenus via ce projet aux données de terrain acquises par ailleurs à contribuer à une meilleure compréhension des gradients observés sur ce site. Au-delà de ces questionnements scientifiques qui ont constitué le cœur du projet, ce travail a permis d'initier une dynamique de recherche autour d'autres axes complémentaires et liés à la thématique principale du projet : les interactions plancton/biofilm et leur rôle dans l'impact et le devenir des contaminants métalliques, ou encore le rôle des microorganismes dans la régulation du transfert de contaminants inorganiques vers les niveaux trophiques supérieurs.

I.5. Objectifs de la thèse et organisation du manuscrit

A travers l'état de l'art qui vient d'être réalisé ici, il apparait clair que les études sur l'écologie des communautés microbiennes ont connu un développement important ces dernières années avec de nouvelles avancées techniques. Les nouvelles thématiques de recherche en lien avec le réchauffement global ou les microplastiques dans les océans et les récentes avancés dans le séquençage de l'ADN ont permis d'avoir accès à un grand nombre de données taxonomiques et ainsi de mieux appréhender la structure, la diversité et les fonctions potentielles des communautés microbiennes dans les océans. Une question clé en écologie

microbienne marine est d'identifier les facteurs environnementaux responsables des variations spatiales et temporelles de la diversité et de la composition des communautés microbiennes. Les relations entre les variations de conditions environnementales telles que la salinité, la température ou la profondeur par exemple, et les communautés microbiennes, sont très bien décrites dans la littérature. Contrairement aux écosystèmes terrestres, la contribution des contaminants chimiques d'origine anthropique à l'écologie des communautés microbiennes marines reste largement ignorée. Ainsi, l'impact des contaminants métalliques, notamment en zone côtière, sur les communautés microbiennes planctoniques et de biofilm reste très peu étudié. L'influence des contaminants et la réponse des communautés mis en évidence sont souvent complexes et dépendent du type de contamination, de l'environnement et du compartiment étudié. La complexité à la fois des contaminations et des communautés microbiennes et le manque d'étude de terrain rend difficile la prédiction d'une tendance globale du comportement des communautés face à une contamination métallique.

En parallèle des études de terrain, les approches expérimentales réalisées au laboratoire sont nécessaires pour comprendre les processus de contamination spécifiques impliqués dans les réponses des communautés microbiennes observés sur le terrain. Toutefois, ces études en conditions contrôlées sont souvent très réductionnistes, avec seulement un ou deux contaminants testés, occultant ainsi une grande partie des interactions entre les microorganismes ou entre les contaminants et l'influence d'autres variables environnementales. La grande variété des polluants inorganiques (Cd, Cu, Pb, Zn) pris en compte individuellement ainsi que les zones d'études conduisent à des résultats variables, parfois contradictoires. Ceci pourrait être expliqué par la complexité des processus en jeu dans les phénomènes de spéciation, de biodisponibilité, de toxicité et de réponse des communautés. Cette variabilité pourrait s'expliquer par les caractéristiques environnementales intrinsèques à la zone d'étude mais aussi à la variabilité spatio-temporelle, à la diversité génétique et au mode de vie des microorganismes présent dans l'écosystème d'intérêt et trop peu souvent pris en compte dans les études d'impact.

Une meilleure compréhension des effets de la contamination en ETMs sur les communautés microbiennes permettrait aussi une meilleure évaluation du risque causé par la contamination métallique dans les zones côtières fortement anthropisées. Via l'adoption d'une approche holistique et l'utilisation des techniques de séquençage, la réponse des

communautés microbiennes à une contamination multiple aux ETMs pourra être étudiée. Les objectifs étant de mettre en évidence des variations spatio-temporelles de diversité et de composition des communautés microbiennes en fonction des paramètres environnementaux d'une part, et d'identifier et de hiérarchiser les facteurs environnementaux naturels et anthropiques régissant ces variations d'autre part. Enfin, en ciblant les communautés microbiennes dans deux compartiments, planctoniques et associées à une surface, nous tenterons de mettre en évidence l'influence du mode de vie sur l'impact d'une contamination métallique au travers des mécanismes de résistance et des réponses taxonomiques et fonctionnelles associées à chaque compartiment.

Les différents chapitres de cette thèse ont comme objectif commun d'apporter de nouvelles connaissances sur les communautés microbiennes ayant un mode de vie planctonique ou attaché en relation avec une multicontamination forte en ETMs dans un écosystème marin côtier. Ainsi, la suite de ce manuscrit se décline en 6 chapitres, parmi lesquels 4 sont présentés sous forme d'articles scientifiques, acceptés, soumis ou en préparation visant à étoffer les connaissances actuelles sur ce sujet.

- Le **chapitre II** détaille les approches de terrain et expérimentales appliquées durant ce travail de thèse, ainsi que les différents paramètres mesurés ou étudiés et les analyses bioinformatiques et statistiques utilisées.
- Le **chapitre III** présente les résultats basés sur plusieurs campagnes de terrains et d'expérimentations au laboratoire. Dans ce chapitre, les liens entre la contamination en ETMs dans la colonne d'eau et l'abondance et la structure des communautés ultraphytoplanctoniques par cytométrie en flux ont été étudiés.
- Le **chapitre IV** est basé sur une étude de terrain caractérisant l'impact de la contamination en ETMs sur l'abondance et la structure des communautés de procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées) et autotrophes (cyanobactéries) de surface et de fond déterminés par cytométrie en flux et par métabarcoding.
- Le **chapitre V** est basé sur la même étude de terrain que dans le chapitre précédent, mais cette fois la densité et la structure des communautés des biofilms marins le long du gradient de contamination en ETMs ont été analysées par qPCR et par la technique de séquençage afin de mettre en évidence les facteurs environnementaux clés structurant les communautés de biofilm mais aussi leurs relations avec les communautés planctoniques.

- Le **chapitre VI** s'articule autour de deux expériences en mésocosmes au laboratoire afin de mettre en évidence les effets spécifiques du Cu, du Pb ou d'un cocktail des deux contaminants sur les communautés de procaryotes provenant d'une zone très peu contaminée et de déterminer le potentiel adaptatif de ces communautés pré-exposées face à une nouvelle contamination en Cu.
- Le **chapitre VII** présente une discussion générale autour des principales conclusions qui reposent sur les résultats obtenus au cours de ce travail, ainsi que les perspectives de recherche qui en découlent.
- Les deux dernières parties de ce manuscrit correspondent aux références bibliographiques et aux annexes correspondants aux différents articles présentés.

CHAPITRE II. MATERIELS ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours des études constituant ce travail de thèse sont présentés. Dans un premier temps, les sites de prélèvements, d'immersion ainsi que les systèmes expérimentaux sont décrits. Les protocoles détaillés du nettoyage spécifique du matériel au regard des analyses de métaux traces, des prélèvements, du conditionnement, et du stockage de chaque échantillon sont fournis dans la section Matériels et méthodes et/ou dans le matériel supplémentaire des différents articles qui composent cette thèse. Ensuite, les différents paramètres mesurés et les techniques utilisées pour chaque analyse seront présentés. Enfin, les traitements bioinformatiques appliqués aux données de séquençage et les différentes analyses statistiques réalisées sur l'ensemble des jeux de données seront détaillés.

II.1. Présentation des sites de prélèvement, d'immersion et des systèmes expérimentaux

II.1.1. Sites de prélèvement et d'immersion

Ce travail de thèse a été centré sur le site atelier de la rade de Toulon. Au cours de 2 campagnes de terrain (17 février 2014 et 16 février 2015), d'un suivi mensuel (d'octobre 2012 à décembre 2017), d'une expérimentation *in situ* d'un mois (du 1er au 28 juin 2015) et de prélèvements en mer pour alimenter des expériences en laboratoire (mars 2015, avril 2015, mai 2016 et mai 2017), des échantillons d'eau, de biofilm et de sédiment ont été collectés dans la rade de Toulon à différents sites et sont détaillés dans la Figure II-1 et le Tableau 2.

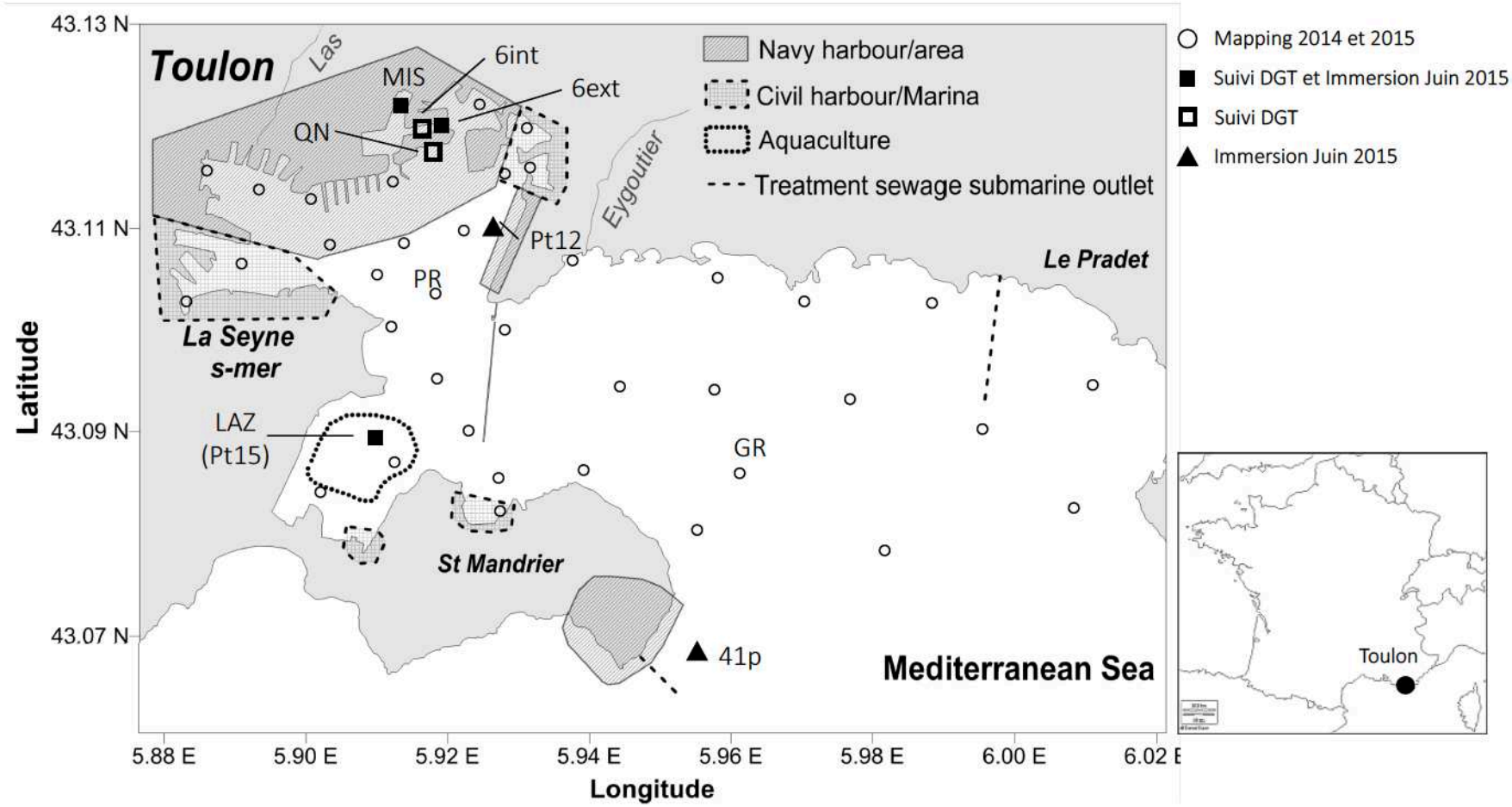


Figure II-1 Carte du site d'étude avec les stations de prélèvement d'eau pour les campagnes de terrain (cercles, carrés pleins et vides et triangles), le suivi mensuel (carrés) et l'immersion (carrés pleins et triangles), ainsi que la délimitation spatiale des activités anthropiques majeures dans la rade de Toulon.

Tableau II-1 Description des sites de prélèvement dans la rade de Toulon durant les différentes campagnes de terrain ou pour la mise en place des expérimentations en laboratoire. Le suivi DGT est présenté dans l'**article 1** (Chapitre III). Les 2 mapping et le microcosme sont présentés dans l'**article 2** (Chapitre III). L'immersion est présentée dans les **articles 3 et 4** (Chapitre IV et V, respectivement). Les mésocosmes 1 et 2 sont présentés dans l'**article 5** (Chapitre VI). Les sites en gras représentent les sites utilisés pour les campagnes de terrain ou les expérimentations en laboratoire.

Site	Localisation	Latitude	Longitude	Mapping 2014	Mapping 2015	Suivi DGT	Immersion	Microcosme	Mésocosme 1	Mésocosme 2
Cs	PR	43°7'19.2"N	5°55'29.28"E	X	X					
MIS	PR	43°7'16.8"N	5°54'47.52"E	X	X	X	X	X		
Es	PR	43°6'1.2"N	5°54'45"E	X	X					
1	PR	43°7'10.2"N	5°55'48.6"E	X	X					
1p	PR	43°6'54"N	5°55'40.8"E	X	X					
QN	**PR**	**43°6'57"N**	**5°55'51.6"E**	**X**	**X**	**X**				
3	PR	43°7'1.2"N	5°55'3.72"E	X	X					
4	PR	43°6'49.2"N	5°54'43.56"E	X	X					
5	PR	43°6'43.2"N	5°54'4.32"E	X	X					
6int	**PR**	**43°6'48.6"N**	**5°53'31.2"E**		**X**	**X**				
6ext	**PR**	**43°6'56.28"N**	**5°53'9.6"E**		**X**	**X**	**X**			**X**
7_1	PR	43°6'21.06"N	5°53'30.6"E	X	X					
7_2	PR	43°6'9.24"N	5°52'57.72"E	X	X					
8	PR	43°6'27.72"N	5°54'6.18"E	X	X					
9	PR	43°6'20.76"N	5°54'37.14"E	X	X					
10	PR	43°6'36.24"N	5°54'44.7"E	X	X					
11	PR	43°6'35.4"N	5°55'15.6"E	X	X					
12	**PR**	**43°6'38.88"N**	**5°55'40.8"E**	**X**	**X**		**X**			

13	PR	43°6'15"N	5°55'0"E	X	X					
14p	PR	43°5'45.6"N	5°55'4.8"E	X	X					
LAZ	**PR**	**43°5'22.2"N**	**5°54'40.26"E**	**X**	**X**	**X**	**X**			**X**
16	PR	43°5'6.6"N	5°54'10.2"E	X	X					
17	PR	43°5'10.8"N	5°54'43.5"E	X	X					
18	PR	43°5'22.2"N	5°55'13.2"E	X	X					
19p	GR	43°5'22.2"N	5°55'13.2"E	X	X					
SMS	GR	43°4'57"N	5°55'39"E	X	X					
22	GR	43°5'58.68"N	5°55'41.64"E	X	X					
23p	GR	43°6'21.6"N	5°56'38.76"E	X	X					
24	GR	43°5'46.44"N	5°56'28.62"E	X	X					
25	GR	43°5'16.86"N	5°56'22.68"E	X	X					
27	GR	43°4'50.58"N	5°57'32.46"E	X	X					
28	GR	43°5'12.42"N	5°57'45.42"E	X	X					
29	GR	43°5'46.2"N	5°57'15.24"E	X	X					
30	GR	43°6'11.04"N	5°57'28.44"E	X	X					
31	GR	43°6'9.12"N	5°58'13.32"E	X	X					
32	GR	43°5'33.54"N	5°58'33.12"E	X	X					
33	GR	43°6'5.82"N	5°59'19.5"E	X	X					
34	GR	43°5'20.46"N	5°59'40.02"E	X	X					
36	GR	43°5'37.56"N	6°0'39.24"E	X	X					
37	GR	43°5'0.6"N	6°0'23.46"E	X	X					
41p	**GR**	**43°4'10.44"N**	**5°57'30.9"E**	**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	
52	GR	43°4'39.96"N	5°58'40.86"E	X	X					

II.1.1.1. Suivi mensuel de la rade de Toulon : suivi DGT (Article I, Chapitre III)

Un suivi à long-terme (5 ans), d'octobre 2012 à Décembre 2017 a été réalisé dans la PR de Toulon. D'octobre 2012 à Août 2014 puis de Février 2016 à Décembre 2017, le suivi a été réalisé sur 4 sites. Un cinquième site de prélèvement a été ajouté entre Septembre 2014 et Janvier 2016, afin d'étudier l'influence du stockage de sédiments issus d'opérations de dragage dans la rade de Toulon. Les 4 sites permanents étaient LAZ (ou Pt15), QN, MIS et 6ext. Le site LAZ (ou Pt15) est dans la baie du Lazaret, proche des fermes aquacoles. Le site QN est situé à côté du quai Noël, proche de la construction d'un nouveau quai impliquant une opération de dragage. Le site MIS est situé dans la darse Missiessy dans la zone militaire, à l'entrée des quais d'accueil et d'entretien de sous-marins à propulsion nucléaire. Le site 6ext est situé dans le canal Suffren, dans la zone militaire. Enfin, le cinquième site temporaire appelé 6int était aussi situé dans le canal Suffren. Il était situé dans une zone fermée, délimitée par une jupe géotextile retenant les sédiments et l'eau environnante. A l'intérieur de cette zone étanche, des sédiments provenant d'opérations de dragage sur le point QN étaient déposés régulièrement.

II.1.1.2. Campagnes de terrain : mapping (Article 2, Chapitre III)

Deux campagnes de prélèvement à haute fréquence spatiale ont été réalisées le 17 février 2014 et le 16 février 2015, sur 41 et 43 sites, respectivement, permettant de couvrir la totalité de la rade de Toulon et l'essentiel des sources ponctuelles de contaminants. En 2014, l'échantillonnage a été réalisé sur 24 sites dans la PR et 17 dans la GR et en 2015 sur 26 sites dans la PR et 17 dans la GR. Les deux points supplémentaires en 2015 correspondent aux points 6int et 6ext décrits précédemment.

II.1.1.3. Immersion in situ (Projet PREVENT) (Articles 3 et 4, Chapitres IV et V)

Un suivi à moyen terme (1 mois), du 1er au 28 juin 2015 a été réalisé à 5 sites. Les sites ont été sélectionnés pour être représentatifs du gradient de contamination qui a été mis en évidence par des études antérieures (Tessier *et al.*, 2011; Jean *et al.*, 2012) et les deux mappings décrits

précédemment dans la rade de Toulon, et réalisés avant ce suivi. Ainsi, le point 41p, situé à l'extérieur de la GR et ouvert sur la Méditerranée a été le site utilisé dans ce suivi comme le site de référence très peu contaminé. Le point 12 (Pt12) est un site intermédiaire en termes de contamination, tout comme le Pt15 (ou LAZ) déjà présenté. Le point 12 est situé dans la PR, sur le passage des bateaux de croisière Corsica Ferry et des navettes permettant la liaison entre le port de Saint-Mandrier et le port de Toulon, notamment. Bien que ces deux sites soient considérés tous les deux comme des sites intermédiaires, les pressions anthropiques s'exerçant sont différentes : au Pt12 les pressions sont principalement liées au trafic maritime et à la remise en suspension de sédiment dans la colonne d'eau, alors qu'au Pt15 les pressions sont liées à l'aquaculture. Enfin, les sites MIS et 6ext, déjà présentés, sont situés dans la PR et correspondent à deux sites très contaminés dans la rade de Toulon.

II.1.2. Systèmes expérimentaux

II.1.2.1. Expériences en microcosmes (Article 1, Chapitre III)

Deux expériences en microcosmes en conditions contrôlées ont été réalisées au cours de ce travail de thèse et ont permis de tester la réponse des communautés ultraplanctoniques autotrophes et hétérotrophes d'un site peu contaminé à une contamination métallique. Pour réaliser ces microcosmes, deux eaux de mer chimiquement contrastées et une carotte de sédiment ont été prélevés. L'eau de mer peu contaminée a été prélevée au point 41p alors que l'eau de mer contaminée et la carotte de sédiment ont été prélevés au point MIS. L'eau de mer utilisée pour réaliser les microcosmes à préalablement été filtrée sur un filtre de 10 µm, afin d'éliminer les organismes brouteurs. Des tests préliminaires avaient démontré que la présence d'organismes brouteurs, même en très faible nombre (quelques individus) lorsque la préfiltration n'est pas efficace à 100% entraînait une perte importante et rapide (en moins de 48h) de l'abondance des communautés ultraphytoplanctoniques (communication personnelle). Les microcosmes ont été préparés dans des bouteilles FEP (« Fluorinated ethylene propylene », Nalgene) transparentes de 1 litre (Figure II-2). L'utilisation de bouteilles FEP empêche l'adsorption des métaux sur les parois des bouteilles et permet donc de conserver les concentrations en ETM voulues dans chaque condition. Une fois tous les microcosmes préparés, les bouteilles ont été placées dans une chambre de culture (Snijders

Scientific) à 20°C et soumises à un cycle jour/nuit de 12h/12h, avec un éclairement lumineux de 51.3 µmol.m^2.s^{-1} durant la totalité de l'expérience.

Figure II-2 Microcosme installé en laboratoire dans une chambre de culture.

La première expérience s'est déroulée entre le 3 mars et le 27 mars 2015 (24 jours). Elle a consisté en 5 conditions : un contrôle eau de mer peu contaminée (41p), un contrôle eau de mer contaminée (MIS), un ajout artificiel d'ETM dans l'eau de mer peu contaminée (41p + ETM), un ajout d'ETM et de nitrates dans l'eau de mer peu contaminée (41p + ETM + NO_3^-, et un mélange d'eau de mer peu contaminée et contaminée (41p + MIS).

La deuxième expérience s'est déroulée entre le 16 avril et le 12 mai 2015 (27 jours). Elle a consisté en 3 conditions : un contrôle eau de mer peu contaminée (41p), un ajout d'eau de mer contaminée par la remise en suspension de sédiments contaminés (41p + Elutriat) et un ajout d'ETM dans de l'eau peu contaminée (41p + ETM). La préparation de l'élutriat a consisté à mettre en contact durant 24h et sous agitation, la couche de surface des sédiments (0-2 cm) avec de l'eau de mer contaminée de MIS, afin d'imiter une remise en suspension de sédiments contaminés dans la colonne d'eau.

II.1.2.2. Expériences en mésocosmes (Projet IMPRECI) (Article 5, Chapitre VI)

Un système expérimental de plus grande envergure a été utilisé au cours de deux expérimentations simulant des phénomènes de contamination d'eau de mer par du Cu et/ou du Pb. Les effets spécifiques de ces expositions sur des communautés d'ultraplancton et de biofilm microbien ont ainsi été évalués. Ce dispositif a reposé sur l'utilisation de 12 bidons LDPE (Nalgene) remplis avec 20 litres d'eau préalablement filtrée avec un filtre Polycap 5-10 µm (Whatman) permettant de comparer 4 conditions expérimentales en triplicats (Figure II-3). La préfiltration a permis d'éliminer l'essentiel des organismes brouteurs de l'eau utilisée pour la mise en place des mésocosmes.

Figure II-3 Dispositif expérimental en mésocosmes. A : Vue de devant du mésocosme ouvert. B : Vue arrière du mésocosme. C : Vue du mésocosme ouvert avec les bidons de 25 litres. D : Vue de devant du mésocosme fermé avec les 4 bidons d'alimentation de 50 litres. E : Vue ouverte du mésocosme avec les néons éclairés. F : Vue ouverte du mésocosme avec un zoom sur un bidon d'alimentation et un néon éclairé.

Afin de garantir l'absence de contamination en ETM lors de l'échantillonnage, du transfert d'eau et de l'incubation, de nombreuses précautions ont été prises. Les prélèvements d'eau de mer ont été réalisés à l'aide d'une pompe à membrane en téflon (AstiPure II), connectée à des tuyaux en téflon. Les bidons de stockage ainsi que le matériel de

filtration étaient aussi en téflon ou en LDPE. Les mésocosmes eux-mêmes, ainsi que tout le système d'alimentation, d'évacuation et d'immersion (tuyaux, supports de plaques de biofilm et de DGT) étaient constitués de matériaux similaires (téflon, H/LDPE ou plexiglass). L'intégralité du matériel utilisé a subi un protocole de décontamination adapté aux traces métalliques dont les détails sont fournis dans l'**article 5** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires). Afin de limiter la contamination des bidons par voie aérienne, une enceinte de confinement close les entourant a été installée, et les expérimentations se déroulaient dans une salle dédiée. Enfin, le renouvellement d'eau d'une condition donnée est assuré via de l'eau du même site, prélevée et stockée de la même façon pour ne pas modifier les concentrations en ETM au cours de l'expérience. La température de l'air et de l'eau lors de l'expérimentation était maintenue stable et très proche de celle mesurée *in situ* à la même période grâce à un climatiseur dimensionné pour la salle où se déroulaient les expériences. La première année, une température moyenne de l'air de 19 ± 1.6°C à l'extérieur et de 23 ± 1.5°C à l'intérieur du mésocosme ont été maintenues durant toute la durée de l'expérimentation. La deuxième année, une température moyenne de l'air de 19 ± 2.2°C à l'extérieur et de 22 ± 2.0°C à l'intérieur du mésocosme ont été maintenues durant toute la durée de l'expérimentation Pour que cette climatisation soit efficace à l'intérieur de l'enceinte expérimentale, un système de ventilation muni de filtres à particules facilitait le renouvellement d'air autour des mésocosmes tout en limitant la contamination en ETM par les particules atmosphériques. La qualité de la lumière en surface des bidons a été choisie pour se rapprocher au maximum des conditions naturelles via l'utilisation de néons d'aquariophilie à spectre lumineux complet. L'intensité lumineuse incidente et la photopériode ont été choisies pour se rapprocher le plus possible des conditions utilisées pour les microcosmes précédemment décrits, soit 51.3 $\mu mol.m^2.s^{-1}$ et un cycle jour/nuit de 14h/10h. Afin d'éviter un épuisement rapide des ressources nutritives, une alimentation continue en eau via une pompe péristaltique à 12 canaux (Minipuls Evolution, Gilson) réglée à un débit de 1 $mL.min^{-1}$ permettait de renouveler 50% du volume des mésocosmes par semaine. L'eau servant à cette alimentation provenait du même échantillonnage, permettant de limiter au maximum la variation dans le temps des conditions nutritives dans cette eau d'alimentation. De plus, l'eau d'alimentation était filtrée à 0,2 µm (sur Polycap 150TF, Whatman) après son prélèvement en mer, afin de limiter un apport externe de microorganismes dans les bidons et d'éviter une évolution trop importante de la chimie de

cette eau avant son utilisation. Les analyses en cytométrie en flux ont montré que l'abondance des communautés microbiennes dans ces eaux de réalimentation filtrée sur 0,2 µm ne restait pas nulle mais tout de même très inférieure à l'abondance des communautés dans les bidons expérimentaux (moins de 30% de l'abondance totale dans les conditions) (communication personnelle). Un système d'agitation magnétique permettait de maintenir une turbulence dans chaque bidon, évitant une sédimentation trop importante des particules et/ou de microorganismes au fond des bidons. Les barreaux aimantés utilisés étaient téflonés, afin de limiter la contamination en ETM des mésocosmes. Enfin, une aération artificielle a été mise en place pour éviter toute désoxygénation du milieu. L'air ambiant apporté dans les mésocosmes était filtré par des membranes en téflon de 0,2 µm afin de limiter toute contamination en ETM par des poussières atmosphériques, puis saturée en eau pour limiter l'évaporation. Des plaques en polycarbonate préalablement sablées et nettoyées suivant un protocole rigoureux ont été fixées à des barres de plexiglass et immergées dans chaque bidon au début des deux expériences en mésocosmes afin de permettre la formation d'un biofilm microbien.

La première expérience s'est déroulée entre le 10 mai et le 17 juin 2016 (25 jours). Elle a consisté en 4 conditions : contrôle eau de mer très peu contaminée (41p), ajout de de Cu pour atteindre 150 nM (41p + Cu), ajout de Pb pour atteindre 7 nM (41p + Pb) et ajout de Cu et Pb pour atteindre 150 nM et 7 nM, respectivement (41p + Cu + Pb). Ces concentrations ont été choisies pour mimer les maxima observés dans la rade de Toulon.

La deuxième expérience s'est déroulée entre le 2 mai et le 12 juin 2017 (25 jours). Elle a consisté en 4 conditions : contrôle eau contaminée de façon intermédiaire (LAZ), ajout de Cu dans une eau contaminée de façon intermédiaire pour atteindre 150 nM (LAZ + Cu), contrôle eau de mer très contaminée (6ext) et ajout de Cu dans une eau très contaminée pour atteindre 150 nM (6ext + Cu).

II.2. Les paramètres mesurés

Les prélèvements des échantillons d'eau, de sédiment et de biofilm pour les analyses physico-chimiques, biologiques et la mise en place des expérimentations en microcosmes et en mésocosmes, ainsi que les différents traitements associés, sont détaillés dans les sections

matériels et méthodes ou dans le matériel supplémentaire des articles présentés dans cette thèse. Dans cette partie, les différents paramètres physico-chimiques et biologiques mesurés et la ou les méthodes utilisées pour chaque paramètre sont listés.

II.2.1. Caractérisation physico-chimique des échantillons prélevés

II.2.1.1. Mesures *in situ* des caractéristiques physico-chimiques de l'eau

Les caractéristiques physico-chimiques incluant la température (°C), l'oxygène dissous (concentration en $mg.L^{-1}$ et saturation en %), le pH, la salinité, la turbidité et la concentration en chlorophylle *a* ($\mu g.L^{-1}$) dans la colonne d'eau sur les différents sites échantillonnés ont été mesurés par une sonde multiparamètres (Hydrolab DS5, OTT). Les paramètres de l'eau dans les différentes conditions expérimentales en laboratoire ont été mesurés avec deux sondes : une sonde multiparamètres HQ40d (Hach) pour la température et le pH et une sonde LDO10105 (Hach) pour l'oxygène dissous.

II.2.1.2. Analyses des concentrations en éléments traces métalliques

Les concentrations en Cd, Cu, Pb et Zn totales (eaux non filtrées) et dissoutes (eaux filtrées sur 0,2 µm) ont été mesurées par voltamétrie (DPASV pour « Differential pulse anodic stripping voltammetry ») au laboratoire MIO par le Dr. Cédric Garnier. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un système automatisé basé sur un passeur d'échantillon, 5 pompes Cavro XE 1000 pour l'ajout des standards, un potentiostat AutolabIII (EcoChemie) et une bille de mercure VA663 (Metrohm), le tout contrôlé par le logiciel GPES 4.9 (EcoChemie). Les détails sur l'instrumentation, les conditions d'analyses et le traitement des données sont fournis par Oursel *et al.* (2013) et Cindrić *et al.* (2015) et dans les **articles 1, 2, 3 et 5** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

Afin d'avoir un jeu de données environnementales plus conséquent, en plus des concentrations en ETM totales et dissoutes, les concentrations labiles à partir des éluats des DGT (pour « diffusive gradient in thin film ») ont été mesurées par HR ICP-MS (pour « High Resolution Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy », Element 2, Thermo Finnigan). L'analyse du Pb labile dans les éluats des DGT pour l'**article 2** a été réalisée par spectroscopie

d'absorption atomique (Varian, AA 240Z) par four graphite (Varian, GTA120) au LASEM (LAboratoire de Surveillance, d'analyse et d'Expertise de la Marine) à Toulon. Dans le cadre de l'immersion PREVENT (**article 4)**, un large éventail d'éléments a été analysé avec cette technique : Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, U, V et Zn au Ruđer Bošković Institut (RBI) de Zagreb (Croatie) par le Dr. Dario Omanović.

L'utilisation des DGT est une technique d'échantillonnage passif *in situ* dont le principe repose sur la diffusion des ETM libres ou faiblement complexés à travers un gel diffusif jusqu'à une phase réceptrice à laquelle ils se fixent. L'avantage de l'utilisation des DGT est l'intégration des variations de spéciation et de concentration pendant la période d'échantillonnage et de stockage (Lead *et al.*, 1997). De plus grâce à cette technique il est possible de mesurer la concentration de plusieurs métaux en même temps. Dans notre cas, les DGT ont été immergés pendant 1 mois durant lequel ils ont accumulé les ETM. Ils ont ensuite été récupérés et les ETM cibles ont été extraits en laboratoire avant d'être analysés. L'analyse permet alors d'obtenir une concentration moyenne des éléments cibles sur la durée d'exposition des échantillonneurs. Les détails de ces analyses sont proposés par Dang, Tessier, *et al.* (2014) et Cindrić *et al.* (2017) et dans les **articles 2 et 5** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

II.2.1.3. Analyses des concentrations en nutriments

II.2.1.3.1. Dosage du carbone organique dissous et de l'azote total

Les analyses du carbone organique dissous (DOC) et de l'azote total (TN) ont été effectuées sur un TOC-VCSH (Shimadzu), équipé d'un passeur d'échantillons ASI-5000A, par Gaël Durrieu. À chaque série d'analyse, le matériel certifié de référence (MISSIPPI-3, Environment Canada) est ajouté dans la séquence pour vérifier la stabilité et la justesse analytique. Des détails sont fournis dans tous les articles présentés dans cette thèse (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires) ainsi que par Louis *et al.* (2009) et Dang, Lenoble, *et al.* (2014).

II.2.1.3.2. Dosage des nitrates et des phosphates

Le dosage des nitrates (NO_3^-) a été réalisé suivant la méthode de Wood *et al.* (1967) et modifiée par Le Poupon (1994), par le Dr. Christophe Le Poupon. Cette méthode est basée sur la réduction des nitrates en nitrites suivie du dosage par colorimétrie des nitrites. La précision du dosage est de l'ordre de ± 0,1 µmol.L^{-1} pour les nitrates. Les dosages ont été réalisés à l'aide du Technicon™ Autoanalyzer II.

Le dosage des orthophosphates (PO_4^{3-}) est basé sur le protocole MAGIC (MAgnesium Induced Coprecipitation) développé par Karl and Tien (1992) et mis à jour par Rimmelin and Moutin (2005). Brièvement, ce protocole propose de préconcentrer 25 fois la concentration en phosphates de l'échantillon avant de quantifier les phosphates par une procédure de détection par colorimétrie au bleu de phosphomolybdène. Le dosage est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 et des micro-cuves de 50-mm en quartz SUPRASIL (Hellma Analytics). Ce protocole permet de mesurer des concentrations en phosphate dans l'eau de mer de l'ordre de la dizaine de nanomolaires. Des détails sont fournis dans tous les articles présentés dans cette thèse (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

II.2.2. Caractérisation des communautés microbiennes dans les échantillons prélevés

II.2.2.1. Détermination de la composition des communautés procaryotes (Articles 3, 4 et 5)

II.2.2.1.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique des échantillons d'eau ou de biofilm prélevés a été réalisée avec les kits AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen) et PowerBiofilmDNA isolation (Qiagen) pour les échantillons d'eau et de biofilm respectivement, en suivant rigoureusement les instructions des fournisseurs (Tableau II-2). Pour les échantillons d'eau, avant de réaliser les extractions à l'aide du kit, une lyse enzymatique des cellules présentes dans les échantillons a été appliquée. Le détail des protocoles d'extraction peut être retrouvé dans les **articles 3, 4 et 5** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

Tableau II-2 Récapitulatif des différents jeux de données séquencés, des préparations pour l'envoi au séquençage et des différents prestataires de séquençage.

Jeu de données	Matrice	Extraction	Amplification	Préparation de la librairie	Prestataire de séquençage
PREVENT	Eau	AllPrep DNA/RNA Mini Kit	GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Purification, quantification et mélange équimolaire	GenoScreen
PREVENT	Biofilm	PowerBiofilmDNA	Mastermix GoTaq Long	X	Genotoul
IMPRECI-m² I	Eau	AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Mastermix GoTaq Long	Purification, quantification et mélange équimolaire	GenoScreen
IMPRECI-m² I	Biofilm	PowerBiofilmDNA	Mastermix GoTaq Long	Purification, quantification et mélange équimolaire	GenoScreen
IMPRECI-m² II	Eau	AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Mastermix GoTaq Long	Purification, quantification et mélange équimolaire	GenoScreen
IMPRECI-m² II	Biofilm	PowerBiofilmDNA	Mastermix GoTaq Long	Purification, quantification et mélange équimolaire	GenoScreen

II.2.2.1.2. Amplification de l'ADN extrait par PCR (« Polymerase chain reaction ») et préparation des échantillons pour le séquençage

La région V4-V5 du gène codant pour l'ADN ribosomique 16S a été amplifiée en utilisant les amorces 515F-Y/926R (Parada *et al.*, 2016). Ces amorces ont été choisies car elles donnent une image précise et résolutive des communautés bactériennes et archéennes marines, au regard de leurs proportions respectives dans la communauté procaryote. Les PCR ont été réalisées à l'aide du GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) sauf pour les échantillons d'eau de l'immersion PREVENT qui ont été amplifiés avec l'ADN polymérase GoTaq G2 (PROMEGA). Pour tous les échantillons envoyés à séquencer chez le prestataire GenoScreen, les produits de PCR ont ensuite été purifiés avec des billes AMPure XP (Agencourt Bioscience) et quantifiés par la méthode de Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent (Life Technologies), en suivant les instructions des fournisseurs. Pour le séquençage chez Genotoul, les produits de PCR sont directement envoyés au prestataire. Pour plus de détails, les protocoles de PCR, de purifications et de quantifications sont fournis dans les **articles 3, 4 et 5** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

II.2.2.1.3. Analyses de séquençage haut débit des produits de PCR

Les produits de PCR des échantillons d'eau ont été analysés par le séquençage d'une banque d'amplicons ciblant l'ADNr 16S par la technique Illumina MiSeq 2*250 paires de bases par Genoscreen (Lille, France). Les produits de PCR des échantillons de biofilms et de quelques échantillons d'eau poolés provenant de la campagne de PREVENT (1 échantillon d'eau par site et par profondeur ; n = 10) ont été analysés par le séquençage d'une banque d'amplicons ciblant l'ADNr 16S par la technique Illumina MiSeq 2*250 paires de bases, par la plateforme Genotoul (INRA, Castanet-Tolosan, France).

Les étapes de base du principe de séquençage par la technique Illumina MiSeq sont décrites dans la Figure II-4. Le processus de séquençage commence par la préparation d'une bibliothèque. L'échantillon d'ADN est cisaillé en fragments courts de taille connue, puis des adaptateurs de séquençage sont ligaturés aux deux extrémités de chaque fragment par hybridation. Les fragments sont ensuite placés dans un puits (Flow Cell). Chaque puits contient des oligonucléotides dont les séquences sont complémentaires aux adaptateurs de sorte que l'extrémité libre du fragment d'ADN s'attache aux parois du puits via un appariement de bases. Une étape de PCR convertit le fragment initial en sa séquence complémentaire, ainsi le brin sens (reverse) et le brin anti-sens (forward) sont liés à la surface du puits. Pour amplifier le signal, la PCR est répétée pendant plusieurs cycles, ce qui donne un groupe de copies autour de la copie initiale d'un fragment. Le séquençage cyclique de ces groupes de fragments utilise un processus de séquence par synthèse. Durant chaque cycle de séquençage, un fluorophore attaché à un nucléotide est ajouté au brin d'ADN en formation. Après l'incorporation de chaque nucléotide, une source d'excitation par laser excite le fluorophore et un scanner optique balaye le puit pour identifier les différentes couleurs des fluorophores qui représentent les nucléotides ajoutés à chaque groupe de copies d'ADN. Cette information optique est convertie en base nucléique pour brin d'ADN en formation. À la fin de chaque cycle, le terminateur est retiré et le cycle suivant se poursuit jusqu'à atteindre la longueur de séquence souhaitée. Dans le séquençage paired-end, une fois que la séquence du brin reverse est fini, une amorce lance le séquençage du brin forward de chaque fragment. Chaque puits peut produire 250 millions de séquences d'une longueur comprise entre 250 et 500pb (500 Go de données par puits). Enfin, chaque échantillon contient un code barre unique, composé

de nucléotides, ainsi plusieurs échantillons peuvent être regroupés dans un seul tube, ce qui facilite grandement le débit de séquençage.

Les données brutes de séquençage (série d'images en 4 couleurs) sont ensuite analysées sur plusieurs niveaux à l'aide d'un ensemble de logiciels bioinformatiques à la fin du séquençage. Au cours de la première étape, les données brutes du séquençage sont décryptées en séquences nucléotidiques, appelées « lectures » ou « reads » qui sont ensuite regroupées par code barre qui correspond à un échantillon dans le cadre de cette thèse. Cette analyse de décryptage et de démultiplexage permet de regrouper toutes les séquences produites par le séquençage et ayant le même code barre dans un fichier par échantillon.

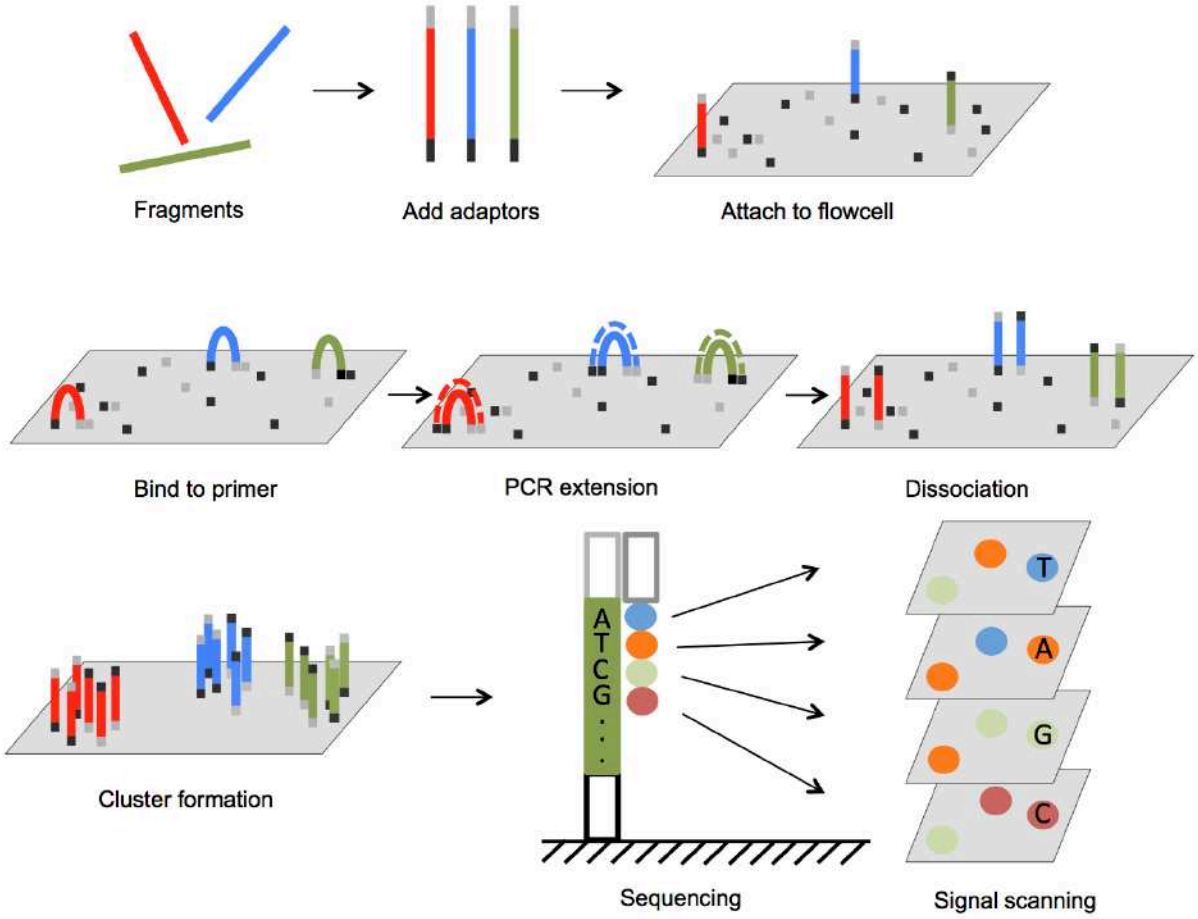


Figure II-4 Présentation des principales étapes de base du séquençage par la technique Illumina MiSeq. Source : https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models.

II.2.2.2. Estimation de la densité des communautés microbiennes dans les biofilms par qPCR (Article 4)

À partir de l'ADN extrait, la densité des communautés microbiennes de chaque biofilm prélevé a été estimée par quantification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S par PCR quantitative (qPCR pour « quantitative polymerase chain reaction ») en utilisant les amorces BAC338f/515R (Borrel *et al.*, 2012). Les réactions d'amplification ont été réalisées en triplicat avec le mastermix GoTaq® SybrGreen (Promega) dans un thermocycler LightCycler 480 (Qiagen). Des détails sur le protocole de qPCR sont fournis dans l'**article 4** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

II.2.2.3. Estimation de l'abondance (Articles 1, 2, 3, et 5) et de la structure (Articles 1 et 2) des communautés ultraplanctoniques par cytométrie en flux

L'estimation de l'abondance (cellules par millilitre) et de la structure des communautés ultraplanctoniques (procaryotes hétérotrophes, pico- et nanophytoplancton) a été réalisée par cytométrie en flux sur l'appareil BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Chaque cellule ultraphytoplanctonique est caractérisée selon ses propriétés optiques de diffusion (taille et forme) et d'autofluorescence (pigments photosynthétiques) et classée parmi 4 groupes : *Prochlorococcus*-like, *Synechococcus*-like, picoeucaryote-like et nanoeucaryote-like. Le groupe *Prochlorococcus*-like est pris en compte dans l'**article 2.** Dans les autres articles, ce groupe n'est plus pris en compte car sa détection est rendue difficile et imprécise de par sa proximité avec le bruit de fond de l'appareil BD Accuri™ C6. L'abondance des procaryotes hétérotrophes libres a été estimée après un marquage au SYBR green (concentration finale de 0.5X). Les données ont été acquises et analysées avec le logiciel BD Accuri CFlow Plus. Les protocoles détaillés pour l'analyse en cytométrie en flux sont issus de Grégori, Citterio, *et al.* (2001) et dans les **articles 1, 2, 3 et 5** (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires).

II.3. Traitements bioinformatiques et analyses statistiques

Pour chaque échantillon, des dizaines de milliers de reads sont produits. Ainsi, un traitement rigoureux et systématique des séquences ne peut être obtenu que par l'intermédiaire d'un

traitement bioinformatique. Les traitements bioinformatiques ont été réalisés par les pipelines Qiime et DADA2. Dans les parties suivantes, les principales étapes de chaque pipeline, ainsi que leurs avantages et inconvénients sont présentées.

II.3.1. Traitements bioinformatiques des résultats de séquençage

II.3.1.1. Pipeline de QIIME (Articles 3 et 4)

Le principe de l'analyse bioinformatique (prétraitement et traitement des séquences) avec une partie de l'analyse sous QIIME1.9 est présenté dans la Figure II-5. En amont du traitement sous QIIME, la première étape a été d'apparier les séquences reverse et forward avec le logiciel en libre accès PEAR v. 0.9.8 (pour « Paired-End reAd mergeR ») avec les paramètres de base (J. Zhang *et al.*, 2014). Les données appariées sont ensuite regroupées dans un fichier par échantillon où chaque séquence présente un code barre correspondant à l'échantillon dans lequel elle a été identifié.

Le logiciel en libre accès QIIME 1.9 (pour « Quantitative Insights Into Microbial Ecology », Caporaso *et al.*, 2010) a été utilisé pour le traitement des données démultiplexées, appariées et nettoyées. Le nettoyage des données brutes a été effectué par déréplication des données, par l'élimination des séquences de longueur inférieure à 100 pb, des séquences avec des bases ambiguës ou homopolymères et des chimères. Les chimères sont des séquences de bonne qualité mais provenant de biais d'amplification. Une fois les séquences préparées, elles sont clusterisées en OTU au seuil de similarité de 97% selon la méthode Usearch (Edgar, 2010). Pour cela, les séquences sont alignées contre une collection de séquences références dans les bases de données et les séquences qui n'ont pas de référence dans les bases de données sont clusterisées « de novo » entre elles. L'affiliation taxonomique a été réalisée en comparant le représentant majoritaire de chaque OTU à une base de données de séquences connues des gènes de l'ARNr 16S, la base de données SILVA v.128 (Taxonomy Classification) (Quast *et al.*, 2013). A la fin de l'analyse, un fichier BIOM est créé. Il correspond à la table d'OTU et inclut le nombre d'occurrences de chaque OTU par échantillon, ainsi que la taxonomie de chaque OTU. Ce fichier va pouvoir être utilisé pour les analyses de diversité et les analyses statistiques.

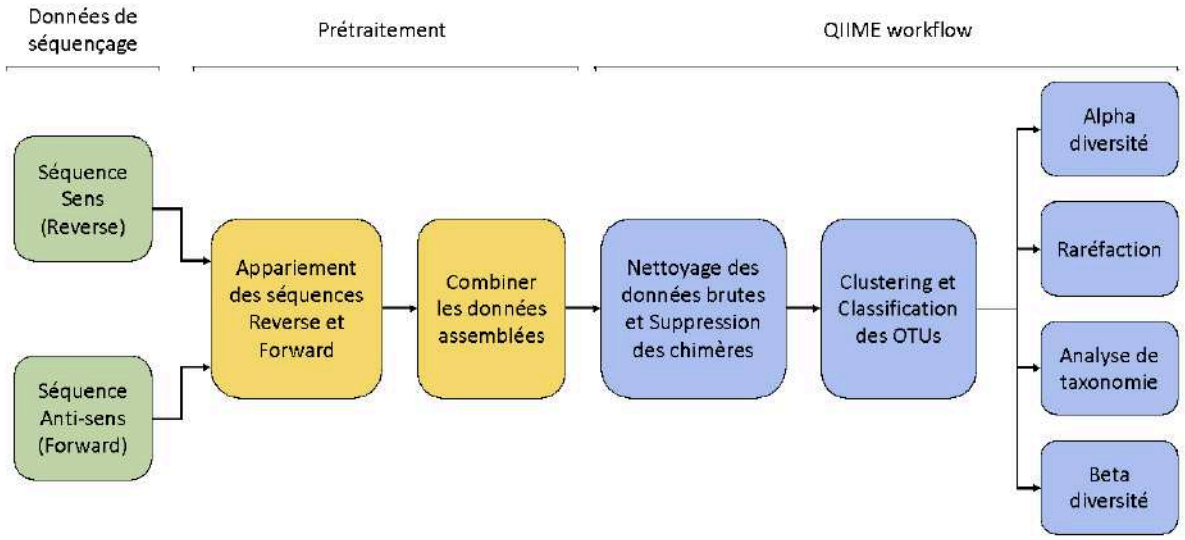


Figure II-5 Schéma conceptuel du traitement des données de séquençage des amplicons du gènes de l'ARNr 16S bactériens avec QIIME 1.9. En vert : les données brutes du séquençage ; en jaune : les étapes de prétraitement des données ; en bleu : les étapes de traitements des données sous QIIME 1.9. Les analyses de diversité alpha et beta peuvent être réalisées avec d'autres logiciels que QIIME comme R par exemple.

II.3.1.2. Pipeline de DADA2 (Article 5)

L'analyse des données de séquençage commence généralement par la construction d'une table d'OTUs correspondant à des groupes de séquences différant le plus souvent de moins de 3%. La caractérisation des échantillons par les OTUs sert généralement de base pour des analyses plus approfondies, où les OTUs sont souvent assimilés à l'observation d'une « espèce » lors de l'affiliation taxonomique. Récemment, de nouvelles méthodes ont été développées afin d'obtenir des variants de séquence d'amplicon (ASV pour « amplicon sequence variant ») à partir de données de séquençage Illumina sans imposer des seuils de dissimilarité arbitraires qui définissent les OTU (Callahan *et al.*, 2016, 2017). Ainsi, la méthode DADA2 déduit les ASVs dans les échantillons avant l'introduction des erreurs d'amplification et de séquençage (Figure II-6). La méthode par ASV (DADA2) a montré une meilleure sensibilité et une spécificité aussi bonne voire meilleure que les méthodes par OTUs (QIIME) (Figure II-7), ce qui doit permettre une meilleure interprétation écologique (Callahan *et al.*, 2016, 2017; Needham *et al.*, 2017; Lambert *et al.*, 2018). La limite principale de l'analyse avec

le pipeline de DADA2 est que l'algorithme de DADA2 ne peut pas identifier efficacement les ASV dont la fréquence est faible.

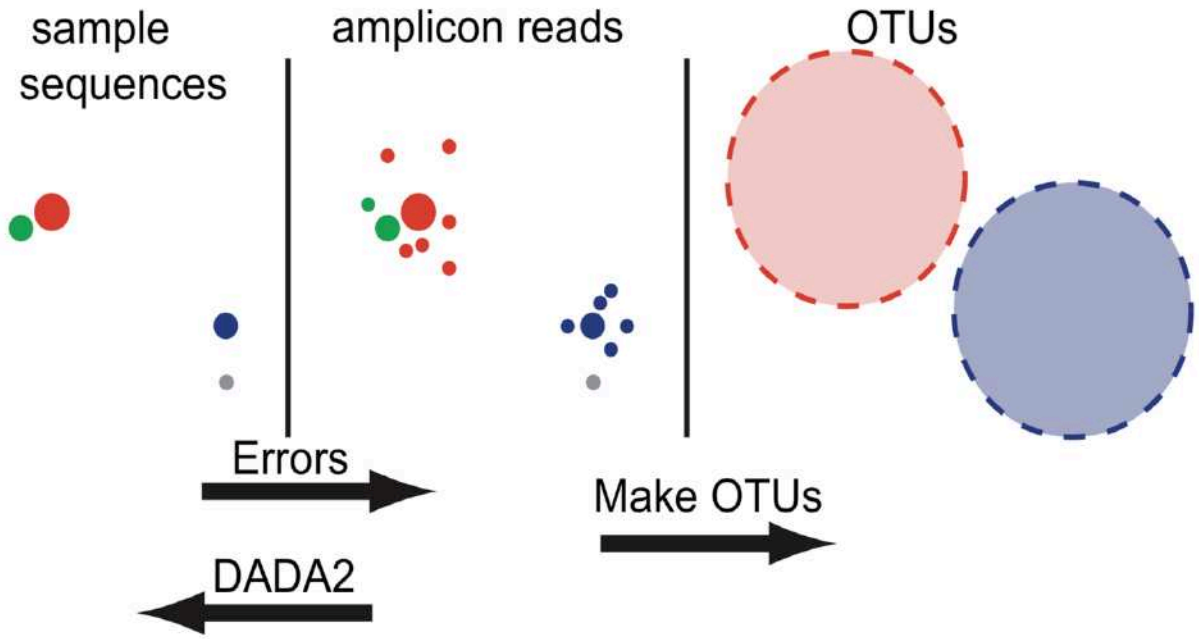


Figure II-6 Description de l'approche DADA2. Les cercles représentent des ensembles identiques de séquences de taille proportionnelle à l'abondance et la couleur correspond à la séquence sans erreur réelle (il existe 4 séquences différentes dans l'échantillon : rouge, bleu, vert et gris). Les erreurs sont introduites par le séquençage d'amplicons de la partie gauche vers la partie centrale du schéma. Les méthodes basées sur la formation d'OTUs regroupe les séquences similaires, faussement positive. DADA2 utilise un modèle statistique d'erreurs d'amplicons pour déduire directement les ASVs à partir des séquences de l'échantillon. D'après Callahan *et al.* (2016).

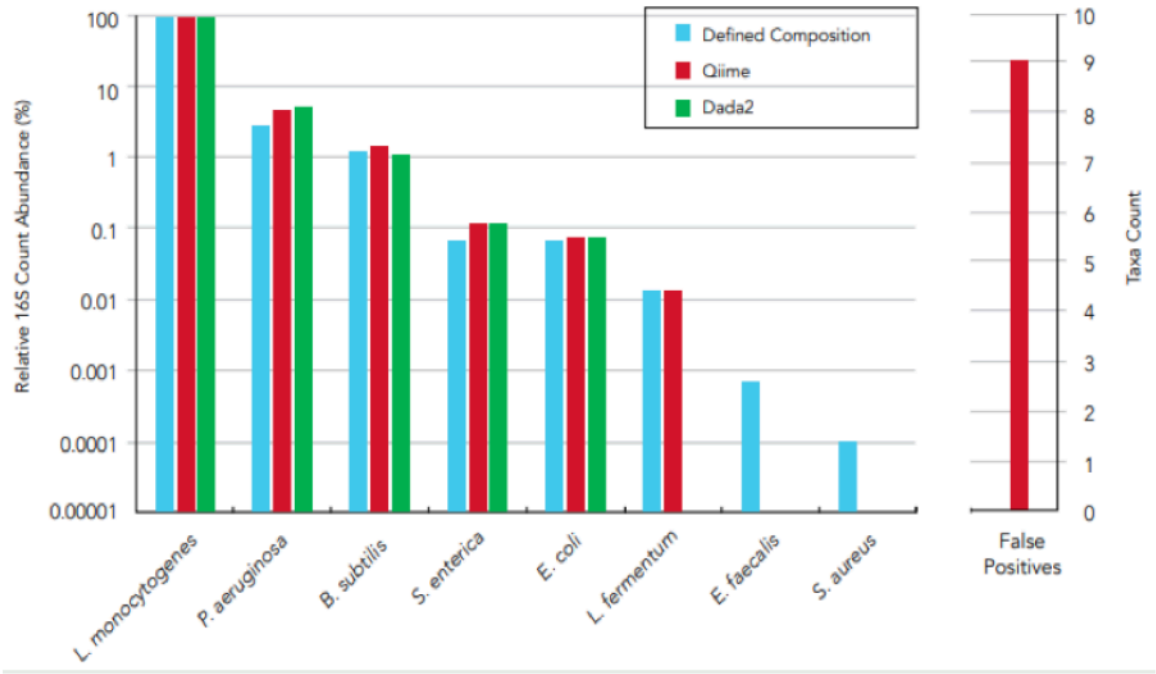


Figure II-7 Résultats de séquençage des amplicons du gènes de l'ARNr 16S de différentes communautés microbiennes analysés avec les pipelines QIIME 1.9 et DADA2. Le séquençage a été réalisé avec la technique de Illumina® MiSeq™ et a généré 93 762 séquences appariées (2 x 300 pb). L'analyse avec DADA2 n'a montré aucun faux positif alors que l'analyse sous QIIME a prédit 9 faux positif. Lorsque la diversité de l'échantillon est élevée, la précision des deux analyses est similaire. En revanche, plus la diversité de l'échantillon est faible, plus l'analyse sous QIIME va générer des faux positifs. Source : https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/the-microbiomics-enlightenment.

Le package en libre accès DADA2 (pour « Divisive Amplicon Denoising Algorithm », (Callahan *et al.*, 2016) sur R a été utilisé pour le traitement des données démultiplexées de séquençage des amplicons du gènes de l'ARNr 16S des échantillons présentés dans l'**article 5**. Le package DADA2 implémente l'ensemble du traitement des données de séquençage présenté précédemment mais dans un ordre différent : qualité des séquences, filtration et trimming, déréplication, denoising, assemblage des séquences reverse et forward, construction d'une table (ici d'ASVs), suppression des chimères et assignement de la taxonomie (Figure II-8). DADA2 déduit les séquences des échantillons selon un nouveau modèle qualitatif d'erreurs dues au séquençage. Ainsi, DADA2 déduit la composition de l'échantillon en divisant le nombre d'amplicons par le nombre d'erreurs calculé par le modèle (Callahan *et al.*, 2016).

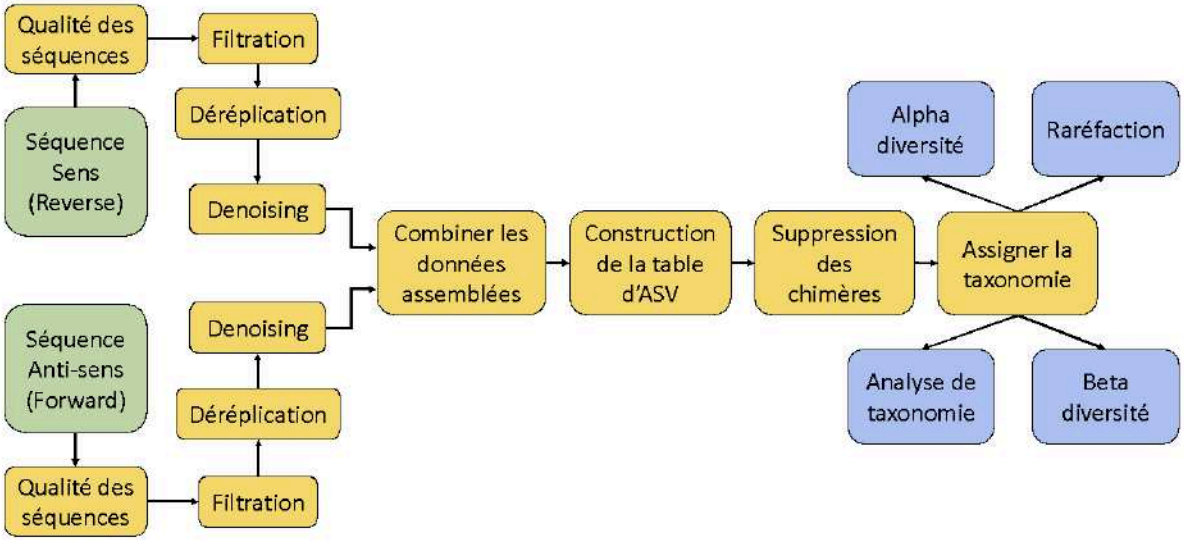


Figure II-8 Schéma conceptuel du traitement des données de séquençage des amplicons du gènes de l'ARNr 16S bactériens avec DADA2.En vert : les données brutes du séquençage ; en jaune : les étapes de traitement des données sous DADA2 ; en bleu : les analyses de diversité et les analyses statistiques complémentaires.

II.3.2. Analyses statistiques des données de séquençage

L'analyse post-séquençage et le traitement bioinformatique ont impliqué des manipulations statistiques qui ont contraint à l'utilisation de données normalisées, dans l'optique de donner le même « poids » à chaque échantillon. Pour ce faire, les données ont été sous-échantillonnées au même nombre de séquences par échantillon. Généralement, les données sont normalisées par le nombre de séquences de l'échantillon qui contient le moins de séquences ou par un nombre de séquences choisi volontairement pour conserver une profondeur de séquençage intéressante. Dans ce cas-là, les échantillons avec un nombre de séquences inférieur au seuil choisi sont éliminés du jeu de données analysé.

La majorité des analyses statistiques a été réalisée avec le logiciel R et l'interface R Studio (R Core Team, 2017). Le détail des packages, des fonctions, des paramètres et des seuils utilisés pour chaque fonction est fourni dans tous les articles (section matériels et méthodes ou matériels supplémentaires). Certains graphiques et sorties statistiques ont aussi été obtenues avec Cytoscape v. 3.3.0 (Shannon *et al.*, 2003) et LeFSe.

II.3.2.1. Statistiques univariées

Afin de tester la significativité des différences entre des groupes de valeurs, l'homoscédasticité des variances et la distribution normale des valeurs ont été testées, en utilisant un test de Levene et un test de Shapiro respectivement. Si les données étaient normales et si la variance n'était pas significativement différente entre les conditions testées, les données étaient paramétriques. Dans ce cas, une ANOVA (pour « ANalysis Of VAriance ») à un ou deux facteurs a été utilisée. Des tests *post-hoc* de comparaison deux à deux ont été réalisés à l'aide d'un test de Tukey HSD si les résultats des ANOVAs montrent des différences significatives. Dans le cas où les données sont non paramétriques, le test statistique employé a été celui de Kruskal-Wallis. Les tests de corrélation ont été réalisés en utilisant la méthode de Spearman pour déterminer les relations entre les différentes variables biotiques et abiotiques mesurées.

II.3.2.2. Statistiques multivariées

Les analyses en deux dimensions nMDS (pour « Non-metric Multi-dimensional Scaling ») ont été réalisées en utilisant la distance de Bray-Curtis. De plus, associée à la nMDS, des analyses de similarité (ANOSIM pour « Analysis Of SIMilarities ») et des PERMANOVA (pour « PERMutational ANalysis Of the VAriance ») ont été réalisées pour tester statistiquement si les différences observées entre 2 groupes ou plus sont significatives. L'ANOSIM teste si les distances entre les groupes (ou conditions) sont significativement supérieures à la distance dans les groupes. Le test de PERMANOVA teste si la distance est significativement différente entre les groupes. Les deux tests sont sensibles à la variance entre les groupes. Le test de PERMANOVA est généralement plus robuste pour les données écologiques mais reste sensible à l'hétérogénité de la variance entre les groupes. Enfin, des analyses SIMPER (pour « SIMilarity PERcentage ») ont été réalisées pour déterminer les groupes taxonomiques discriminants entre deux conditions (*i.e.* 2 traitements, 2 sites de prélèvement, 2 profondeurs, etc.). Toutes ces fonctions sont issues du package *Vegan* (Oksanen *et al.*, 2016).

Les analyses de redondance (RDA pour « redundancy analysis ») modélisent l'effet d'une matrice X de variables explicatives sur une matrice Y de variables réponses en effectuant une ordination de Y afin d'obtenir des axes d'ordination qui correspondent à des

combinaisons linéaires des variables de la matrice X. Les variables explicatives X peuvent être quantitatives, qualitatives ou binaires. Avant d'effectuer une RDA, les variables explicatives de X ont été centrées, standardisées (si les variables explicatives sont d'unités différentes), transformées (afin de limiter l'asymétrie des variables explicatives) ou normalisées (afin de linéariser leurs relations). La colinéarité entre variables explicatives doit également être minimale pour effectuer une RDA. Afin d'obtenir le meilleur modèle de RDA, les variables explicatives ont été sélectionnées par sélections progressives ou régressives afin d'éliminer les variables explicatives non significatives. Plusieurs valeurs statistiques ont été extraites de la RDA. Le R^2 mesure la force de la relation entre Y et X en calculant la proportion de la variation de Y expliquée par les variables X. Le R^2 ajusté mesure également la force de la relation entre Y et X, mais applique une correction du R^2 afin de tenir compte du nombre de variables explicatives. Enfin, la statistique F correspond à un test global de la significativité de la RDA. Le partitionnement de la variation a été utilisé après avoir fait une RDA pour diviser la variation d'une matrice de variable réponse Y en deux, trois ou quatre jeux de données explicatives. Le résultat d'un partitionnement de la variation a été représenté par un diagramme de Venn sur lequel ont été annotés les pourcentages de variance expliquée par chacun des jeux de données explicatives (ou par leurs interactions).

Les analyses en réseau ont permis d'étudier les relations statistiques entre microorganismes ou entre les microorganismes et les paramètres environnementaux. Elles ont ainsi permis de différentier les microorganismes en termes de conditions préférentielles et aussi de regrouper des microorganismes qui tendent à être retrouvés ensemble de manière non aléatoire (co-occurrence) ou au contraire, à ne jamais être retrouvés ensemble (co-exclusion). Ces relations sont basées sur des corrélations (Pearson, Spearman, Kendall, etc.) et des mesures de distance (Euclidienne, Bray-Curtis, Kullback-Leibler, etc.) afin de mesurer la nature et la force des interactions. Ces mesures ont permis ensuite d'attribuer une relation positive ou négative. La significativité des interactions a été mesurée avec des tests de permutations et de bootstraps. Enfin, toutes les informations générées par l'analyse en réseau ont été visualisées graphiquement. Ainsi, les analyses en réseau ont été réalisées avec le plug-in CoNet v. 1.1.b (Faust and Raes, 2016) et visualisées avec Cytoscape v. 3.3.0 (Shannon *et al.*, 2003).

Les analyses discriminantes linéaire de l'effet de taille (LEfSe pour « Linear discriminant analysis Effect Size ») ont permis d'identifier des biomarqueurs, quel que soit le niveau

taxonomique, qui sont impliqués dans la discrimination de 2 ou plusieurs groupes (Segata *et al.*, 2011). Les analyses LEfSe ont été réalisées sur le site Galaxy (Goecks *et al.*, 2010). Plus de détails sont fournis dans la section matériels et méthodes et dans le matériel supplémentaire de l'**article 3.**

Enfin, la prédiction fonctionnelle d'une communauté microbienne à partir des données de séquençage d'une banque d'amplicons ciblant l'ARNr 16S a été réalisé avec Tax4fun (Aßhauer *et al.*, 2015). Cette approche ne peut pas remplacer une analyse de métagénomique mais elle est très utile pour compléter une analyse de diversité taxonomique. Avec Tax4fun, un lien entre les séquences de gènes d'ARNr 16S et l'annotation fonctionnelle de génomes procaryotes séquencés est réalisé. Cette méthode a fourni une prédiction de profils fonctionnels sur la base des abondances d'OTUs ou d'ASVs affiliés avec la base de données SILVA. L'abondance de chaque OTU ou ASV a ensuite été transformée en profil fonctionnel à l'aide de Tax4Fun en 3 étapes. Premièrement, le profil de l'OTU ou l'ASV « SILVA » a été transformé en profil taxonomique d'organismes procaryotes basé sur la base de données KEGG (pour « Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes »). Ensuite, les abondances estimées des organismes procaryotes « KEGG » ont été normalisées par le nombre de copies de l'ARNr 16S total. Enfin, les abondances taxonomiques normalisées ont été utilisées pour combiner linéairement les profils fonctionnels (KOs pour « KEGG Orthology genes) de chaque organisme « KEGG » afin de prédire le profil fonctionnel de la communauté microbienne. Ces KOs sont organisés en grand métabolismes en accord avec la hiérarchisation des KOs en sous-systèmes. Cette hiérarchisation a été réalisé par Élisa Catão (laboratoire MAPIEM) (Catão *et al. Submitted*).

CHAPITRE III. INFLUENCE DE LA CONTAMINATION DES SÉDIMENTS ET DE L'EAU DE MER SUR L' ABONDANCE RELATIVE DES COMMUNAUTES ULTRAPLANCTONIQUES

III.1. Introduction du chapitre

L'influence de la contamination en éléments traces métalliques sur l'abondance et la structure des communautés ultraplanctoniques (procaryotes hétérotrophes et ultraphytoplancton) est un sujet majeur en écologie microbienne, particulièrement en milieu marin côtier. En effet, ces écosystèmes à l'interface avec les zones terrestres sont sujets à de fortes pressions anthropiques qui génèrent le plus souvent une forte contamination des sédiments et de la colonne d'eau. Dans les zones côtières, il n'est pas rare d'observer des phénomènes de remise en suspension de sédiments dus à des phénomènes climatiques extrêmes (*i.e.* tempêtes), au trafic maritime ou encore à des opérations de dragage. Ainsi, le sédiment remis en suspension, s'il est contaminé peut devenir une source majeure de pollution dans la colonne d'eau et potentiellement affecter les communautés ultraplanctoniques. Les ETM issus de la remise en suspension peuvent être présents sous différentes formes (particulaires ou dissoutes) ayant une influence sur leur biodisponibilité et leur toxicité. Par ailleurs, il a été montré que les ETM pouvaient avoir des effets délétères sur les communautés ultraplanctoniques, au niveau cellulaire (stress oxydatif, réduction des processus métaboliques, voire mort cellulaire) d'une part et au niveau des populations (changement de structure des communautés, acquisition de mécanismes de résistance) d'autre part. Toutefois, la plupart des études montrant les effets des ETM sur les communautés ultraplanctoniques sont conduits en laboratoire sur une ou quelques espèces cultivables ou sur une population simplifiée. De plus, ces études sont souvent basées sur l'analyse d'une contamination simple (un ou deux ETM maximum) sans prendre en compte des phénomènes complexes du milieu naturel comme la remise en suspension de sédiments contaminés. Enfin, dans le but d'identifier les seuils de concentrations en ETMs critiques à partir desquels un effet de la contamination est observé, les concentrations utilisées dans ces études sont très souvent peu représentatives des concentrations réelles retrouvées dans le milieu.

Dans ce contexte, la première partie de ce chapitre est basée sur deux campagnes de terrain à haute fréquence spatiale dans la rade de Toulon en 2014 et 2015 et deux expériences en laboratoires. Au cours de ces études, l'abondance et de la structure des communautés ultraphytoplanctoniques a été déterminées par cytométrie en flux. Les campagnes de terrain ont permis (i) d'étudier la structure des communautés ultraphytoplanctoniques le long des gradients multiples de contamination en ETMs dans la rade de Toulon et (ii) d'identifier les principaux facteurs environnementaux responsables des variations spatiales. Les expérimentations en laboratoire ont permis de (iii) tester l'influence respectives de certains facteurs identifiés comme potentiellement structurant pour les communautés. Ainsi l'influence d'un ajout d'ETMs seul, d'un cocktail ETMs-nutriments et d'une contamination en ETMs due à la remise en suspension de sédiments a pu être étudiée.

La deuxième partie du chapitre est basée sur un suivi mensuel à long terme, d'Octobre 2012 à Décembre 2017, des communautés ultraplanctoniques dans la rade de Toulon par cytométrie en flux. Le but de cette campagne de terrain à plus haute fréquence temporelle a été d'avoir une vision à long terme de la structure des communautés ultraphytoplanctoniques qui se veut complémentaire des campagnes de terrain à haute fréquence spatiale. Les principaux objectifs de ce suivi ont été : d'évaluer à long terme (i) le partitionnement des éléments traces métalliques, leur labilité, leur biodisponibilité et les modifications induites par un dragage et (ii) les liens entre d'une part, la contamination en ETM de la rade de Toulon et ses sources et, d'autre part, l'abondance et la structure des communautés ultraplanctoniques.

III.2. Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area

Cette partie est présentée sous la forme d'un article publié dans la revue *Progress in Oceanography [Coclet, et al., (2018). Progress in Oceanography, 163, 196-213].* Les références sont toutes présentes dans la partie Références à la fin de ce manuscrit.

COCLET Clément[1,2,3], GARNIER Cédric[1,3*], DELPY Floriane[1], JAMET Dominique[1,3], DURRIEU Gaël[1,3], LE POUPON Christophe[1,3], MAYER Marie[1,3], MISSON Benjamin[1,3]

[1]*PROTEE, EA 3819, Toulon University, CS 60584, 83041 Toulon Cedex 9, France*

[2]*MAPIEM, EA 4223, Toulon University, CS 60584, 83041 Toulon Cedex 9, France*

[3]*Université de Toulon, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), UMR7294, 83041 Toulon Cedex 9, France*

** corresponding author, email : cgarnier@univ-tln.fr*

III.2.1. Abstract

Toulon Bay is a Mediterranean coastal marine ecosystem facing important anthropogenic pressures resulting in strong and multiple chemical contamination gradients. In this study, we examined the spatial variations of both abundance and structure of ultraphytoplankton in relation with resources and potentially toxic trace metal concentrations in surface water in Toulon Bay. Sampling and on-field measurements were conducted in February 2014 and February 2015 throughout the entire bay. Strong Cd, Cu, Pb, and Zn contamination gradients in surface water were observed, with the highest levels being recorded in the most anthropized areas, while the open part of Toulon Bay presented levels close to those observed in the open sea. The abundance of Synechococcus-like cells was strongly negatively correlated to the concentrations of Cd, Cu, Pb, and Zn, whereas the abundance of picoeukaryote-like cells was positively correlated to these four trace metals. Trace metal contamination appeared to be one of the most significant contributors to ultraphytoplankton structure by statistically explaining up to 58.4% of its spatial variability. Incubation experiments were conducted to assess the specific impact of trace metal contamination on ultraphytoplankton of Toulon Bay. During around one month, ultraphytoplanktonic communities isolated from an uncontaminated site (representative from offshore communities) were exposed to an artificial cocktail of trace metals representative of the most anthropized part of Toulon Bay (in concentrations and proportions). A 90-99% decrease of total ultraphytoplankton abundance was observed within six days, followed by its recovery before the end of the experiment. This exposure to the trace metal cocktail additionally induced a shift from a Synechococcus-like dominated community, representative of the open sea, to a photosynthetic picoeukaryotes dominated one, mimicking the ultraphytoplanktonic community encountered in the most contaminated sites of the bay. Exposure to either natural waters representing the contaminated sites of the bay or elutriate of sediment resuspension did not promote a noticeable toxic effect on the total abundance of ultraphytoplankton, but affected its community structure, suggesting complex interplays.

Key-words: coastal Mediterranean ecosystem, microbial ecotoxicology, ultraphytoplankton, trace metal contamination, flow cytometry

III.2.2. Introduction

Marine coastal areas provide essential ecosystem goods and services, including shoreline protection, water quality improvement, fisheries resources (Levin *et al.*, 2001; Micheli *et al.*, 2013), as well as habitat and food for migratory and resident species. The distribution and diversity of biotic communities in marine coastal ecosystems are controlled directly or indirectly by natural gradients of salinity, turbidity, and nutrients (Casotti *et al.*, 2003; Veldhuis *et al.*, 2005; Sunda, 2012). In addition to these natural gradients, coastal areas are increasingly subjected to anthropogenic pressures that usually result in human-induced chemical contamination. The Mediterranean Sea is subjected to increasing demographic pressure and both intensive farming and industrial activities that threaten marine ecosystems (The Mermex Group *et al.*, 2011). Urban and industrial wastes (Levin *et al.*, 2001; Oursel *et al.*, 2013), biocides released by anti-fouling coatings (Turner, 2010; Camps *et al.*, 2014), and fuel from nautical traffic (Callender, 2003) as well as historical pollution accumulated in the sediment (Tessier *et al.*, 2011; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015) are well-known and widespread examples. Such chemical contamination represents an increasing threat for marine coastal ecosystems, especially in the Mediterranean Sea.

Picocyanobacteria, mainly Prochlorococcus sp. and Synechococcus sp. (Waterbury *et al.*, 1986; Partensky *et al.*, 1999), eukaryotic picophytoplankton and the smallest component of nanophytoplankton, constitute an essential part of marine ultraphytoplankton (*i.e.* 0.2 - 20 µm phytoplanktonic cells) (Grégori *et al.*, 2001). Ultraphytoplankton contributes to approximately 45 - 70% of the primary production in open-ocean ecosystems and to more than 50% near Northern Mediterranean coasts (Magazzù and Decembrini, 1989; Field *et al.*, 1998; Garcia-Pichel *et al.*, 2003; Scanlan, 2003; Uitz *et al.*, 2010). It therefore plays a major role in biogeochemical cycles and in the functioning of marine ecosystems. The need to understand the factors driving its dynamics and distribution is therefore crucial.

Ultraphytoplanktonic organisms present great physiological and phenotypic plasticities, allowing them to be part of the most successful algal group in the marine environment (Partensky *et al.*, 1996; Charpy and Blanchot, 1998; Veldhuis *et al.*, 2005; Mella-Flores *et al.*, 2011; Ayata *et al.*, 2014). In addition to be controlled by nitrogen and, albeit to a lesser extent, by phosphorus (Beardall *et al.*, 2001; Moutin and Raimbault, 2002; Siokou-Frangou *et al.*, 2010), the productivity and species composition of the marine

ultraphytoplanktonic community are also regulated by low bioavailability of a number of essential metals such as iron, zinc, and copper (Brand *et al.*, 1983; Sunda and Huntsman, 1995; Crawford *et al.*, 2003; Boyd *et al.*, 2010; Oberholster *et al.*, 2010; Sunda, 2012). However, inputs of trace metals by anthropogenic activities as well as sediment, riverine and dust sources into marine coastal environments may result in at least 100-fold enrichment above background levels (Morley *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 2008; Tessier *et al.*, 2011; Jordi *et al.*, 2012; D. Cossa *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Twining *et al.*, 2015), thus no longer representing limiting resources for phytoplanktonic production. Elevated concentrations of trace metals have frequently been shown to have a direct and deleterious effect on ultraphytoplankton (Brand *et al.*, 1986; Payne and Price, 1999; Debelius *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Oberholster *et al.*, 2010; Castro-Bugallo *et al.*, 2014). However, most of these studies were conducted in laboratories and have focused on single species or simplified populations (Brand *et al.*, 1986; Payne and Price, 1999; Wang *et al.*, 2009; Oberholster *et al.*, 2010; Castro-Bugallo *et al.*, 2014). Possible mechanisms of Cu and Zn toxicity include a reduction in total chlorophyll, nitrate reductase activity, and protein content, as well as an increase in the induction of reactive oxygen species, leading to growth inhibition. Although marine ultraphytoplankton dynamics and distributions are widely studied (Zubkov *et al.*, 2000; Grégori *et al.*, 2001; Casotti *et al.*, 2003; Siokou-Frangou *et al.*, 2010; Bonato *et al.*, 2015, 2016), only a few works have targeted the links between ultraphytoplankton distribution or community structure and trace metal contamination in a complex environmental context. Recent studies have reported negative effects of trace metals on larger marine phytoplanktonic communities at different spatial scales (Clements and Rohr, 2009; Jordi *et al.*, 2012; Lafabrie *et al.*, 2013). Copper and lead stresses cause drastic reduction in total biomass of cyanobacterial populations in the sediment (Burnat *et al.*, 2009), whereas cadmium and lead are toxic to natural communities of oceanic phytoplankton, especially Prochlorococcus and Synechococcus populations from the Mediterranean Sea (Brand *et al.*, 1986; Echeveste *et al.*, 2012).The contamination of marine coastal environments by trace metals is thus likely to have significant effects on the phytoplankton functions and, in a wider context, on marine coastal ecosystem functioning.

To improve our understanding of trace metal contamination and ultraphytoplankton interactions, we studied Toulon Bay, which is a Mediterranean semi-enclosed marine coastal ecosystem experiencing strong and multiple chemical contaminations by trace metals,

metalloids, organometallics, and organic pollutants (Tessier *et al.*, 2011; D. Cossa *et al.*, 2014; Pougnet *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Misson *et al.*, 2016). The most enriched chemical contaminants in this bay are trace metals, which present important and historic concentration gradients in both water and sediment. Because of the long-term contamination of this ecosystem and the major gradients observed in a geographically limited and rather environmentally homogeneous area, Toulon Bay represents an ideal marine ecosystem model for the assessment of the impacts of anthropization, especially in terms of trace metal contamination, on marine microorganisms. In this context, the main goals of this study were (i) to determine the links between trace metal or nutrient contaminations and ultraphytoplankton community distribution and structure in surface seawater and (ii) to investigate the respective influence of major trace metal (Cu, Pb and Zn) and nitrate (NO_3^-) contaminations on ultraphytoplankton dynamics and structure. For that purpose, high spatial resolution mapping of surface water of the Toulon Bay was performed in two consecutive years to assess in situ biological and physicochemical gradients. Subsequently, microcosm experiments were set up in the laboratory to compare the effects of mixing artificially or naturally contaminated water of various origins with uncontaminated water on the ultraphytoplanktonic community.

III.2.3. Materials and methods

III.2.3.1. Study site

Toulon Bay, located in the northwestern part of the Mediterranean Sea, is divided into two non-equivalent parts by a seawall (Figure III-1). The large bay (LaB) (~42 km^2) is opened to the sea and subsequently less polluted than the little bay (LiB) (~9.8 km^2), which is more enclosed and submitted to various anthropogenic inputs, particularly substances from industrial and maritime activities. As a result, surface waters and sediments of the bay are strongly polluted with trace metals and metalloids (Tessier *et al.*, 2011; Jean *et al.*, 2012; D. Cossa *et al.*, 2014; Dang, Lenoble, *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015), especially in the northern part of the little bay.

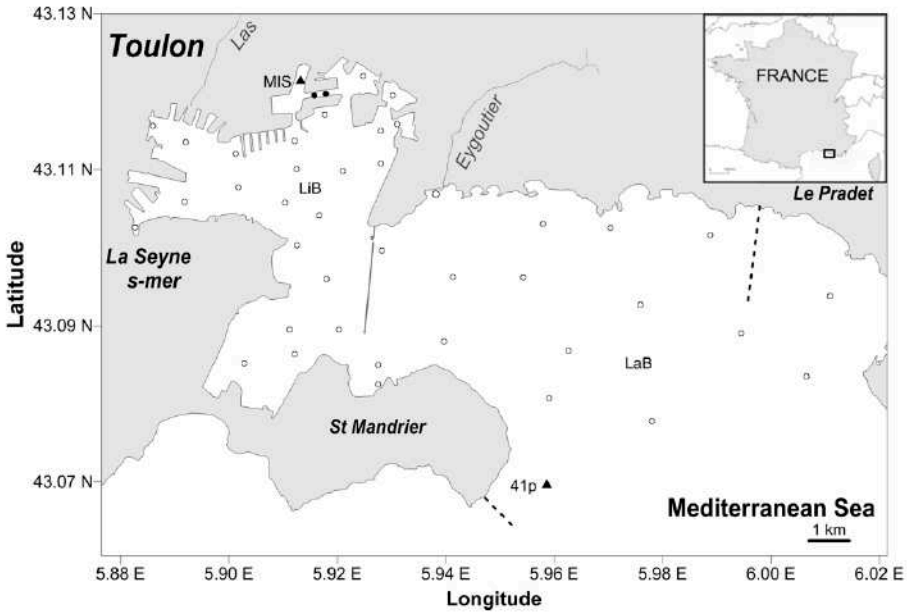


Figure III-1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites. Empty circles represent the 41 sites sampled for both surface seawater mappings and filled circles represent the 2 additional sites sampled for the surface seawater mapping of 2015. Triangles represent the 2 sites sampled for surface seawater (MIS and 41p) or surface sediment (MIS) for the incubation experiments. Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively.

III.2.3.2. Sampling procedures for incubation experiments

Additional surface seawater was sampled at two specific sites, 41p and MIS (Figure III-1), at March 2nd, 2015 for water incubation and at April 13th, 2015 for sediment resuspension incubation. Site MIS is located in the Navy area (nuclear submarine harbor), while site 41p is located in the large bay and connected to the open sea. Water samples were collected in 1-L and 2-L FEP bottles (Nalgene) and in 5-L PTFE bottles (AVLD) that were pre-cleaned as mentioned for the 60-125-mL FEP bottles in section 2.3.

A sediment core was collected at MIS on April 13th, 2015, using a Plexiglas® tube (10 cm in diameter and 1 m long) with the support of the French Navy (boats, materials, divers), following the procedure detailed elsewhere (Dang, Lenoble, *et al.*, 2014). At arrival in the laboratory, the sediment core was sliced with a 2-cm resolution under inert atmosphere (N_2) to preserve redox conditions. An aliquot of surface sediments (0-2 cm layer) was kept at

ambient temperature under inert atmosphere until performance of the sediment resuspension experiment, leading to the sediment elutriate (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015).

III.2.3.3. Water incubation

To assess the impacts of contaminated water on natural ultraphytoplanktonic communities, water incubation was performed from March 3rd to March 27th, 2015 (24 days), using water collected in two sites presenting a large difference in contamination (further called "uncontaminated" for the 41p site and "contaminated" for the MIS site, Figure III-1). At site 41p, 7.5 L of water were collected within the surface layer (1 m depth). A subsample of 3 L was filtered through 0.2-µm cellulose nitrate filters (Sartorius) to eliminate all organisms. The remaining 4.5 L were filtered through 10-µm polycarbonate membranes (Whatman® Nuclepore) to eliminate large debris and most of the grazers. Each filter was previously rinsed with both Milli-Q acid-conditioned water (0.1% HNO_3,) and water from the site to avoid trace metal contamination of the filtrate. At site MIS, 5 L of water were collected within the surface layer (1 m depth). A subsample of 3 L was filtered through 0.2-µm cellulose nitrate filters and the remaining 2 L were filtered through 10-µm polycarbonate membranes.

Fifteen 1-L FEP bottles were used for the incubations, maintaining ultraclean conditions: water with metal concentrations close to the Mediterranean geochemical background (uncontaminated control, condition A), trace metal addition (condition B), trace metal and nitrate addition (condition C), mixing uncontaminated with contaminated water (condition D), and contaminated water (contaminated control, condition E). Each condition was conducted in triplicate. A volume of 0.5 L (determined by weighing; balance Pioneer PA2102, Ohaus) of 10-µm pre-filtered 41p water was poured into each of the A, B, C, and D replicates; 0.5 L of 0.2-µm pre-filtered 41p water were then added to each A, B, and C replicates, and 0.5 L of 0.2-µm pre-filtered MIS water were added to each D replicate. A volume of 0.5 L of 10-µm pre-filtered MIS water was mixed with 0.5 L of 0.2-µm pre-filtered MIS water for each replicate of condition E. Conditions B and C were then artificially enriched with 37 nM of Cu (2.4 µg Cu L^{-1}), 2.5 nM of Pb (0.52 µg Pb L^{-1}), and 100 nM of Zn (6.5 µg Zn L^{-1}). Condition C was additionally enriched with 41 µM of NO3- (0.57 mg N L^{-1}). Trace metal concentrations added in the incubations were determined from maximal values observed during the mapping in 2014, which reached 75 nM for Cu, 5 nM for Pb, and 126 nM for Zn.

Therefore, the final trace metal concentrations in conditions B and C were two times lower than in the most highly contaminated sites of Toulon Bay. The 15 FEP bottles were immediately incubated for 24 days in a phytotron (Snijders Scientific) at 20°C, submitted to a 12/12 day/night cycle with 51.3 µmol.m^2.s^{-1} of white light.

At the beginning and the end of the incubation, samples for trace metal analysis (60 mL) and DOC/TN analysis (24 mL) were collected in each FEP bottle and transferred into FEP and glass tubes, respectively, Samples were pooled to obtain composite samples for each condition and treated as previously described for total and dissolved trace metal analysis. Samples (50 mL) for NO_3^- analysis were also collected in each FEP bottle for each condition and stored at -20°C in 50 mL centrifuge tubes (Falcon) until analysis. Samples for flow cytometry analysis (10 mL) were collected from each replicate at 0, 1, 2, 3, 6, 8, 10, 14, and 24 days and immediately analyzed by flow cytometry.

III.2.3.4. Sediment elutriate incubation

To assess the impacts of sediment resuspension events (*e.g.* storms, boat traffic, dredging, etc.) and the trace metal contamination induced by such events on natural ultraphytoplanktonic communities, sediment elutriate incubation was performed from April 16th to May 12th, 2015 (27 days), using uncontaminated water from site 41p and sediments from the heavily contaminated site MIS (Figure III-1).

For sediment elutriate preparation, 0-2-cm surface sediments were transferred into precleaned 5-L PTFE bottles (AVLD), and filled with 0.2-µm filtered water of the MIS station to reach a solid/liquid ratio equivalent to 1 g.L^{-1} (expressed in dry weigh). The PTFE bottles were then immediately submitted to overhead shaking (15 rpm, Heidolph Reax 20) to mimic sediment resuspension, leading to trace metal remobilization, as evidenced previously (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). After 24 hours of contact time, agitation was stopped for a few minutes in order to allow particle settling; subsequently, the overlying water was collected and immediately filtered under N_2 pressure (~1 bar) through 0.2-µm precleaned cellulose-nitrate membrane filters (Sartorius) using a Sartorius polycarbonate filter holder in order to eliminate microorganisms. The filtered sample obtained is hereafter referred to as the "contaminated-sediment elutriate". Samples for total and dissolved trace metal concentrations (60 mL),

DOC/TN (24 mL) and NO_3^- (50 mL) analysis were collected and analyzed immediately after elutriate preparation.

Finally, at site 41p, 7.5 L of water were collected within the surface layer (1 m). A volume of 3 L of these 7.5 L was filtered through a 0.2-µm filter (cellulose nitrate, Sartorius) and a volume of 4.5 L through a 10 µm-filter (polycarbonate membranes, Whatman® Nucleopore).

Nine 1-L FEP bottles were used for incubations under ultraclean conditions: uncontaminated control (condition F), elutriate addition (condition G), and metal addition (condition H). Each condition was conducted in triplicate. A volume of 0.5 L of 41p water 10-µm pre-filtered was poured into each replicate of conditions F, G, and H; 0.5 L of 41p water 0.2-µm pre-filtered were then added to each replicate of conditions F and H; 0.5 L of contaminated-sediment-elutriate, previously prepared and filtered, were added to each replicate of condition G. Replicates of condition H were artificially enriched with 0.4 nM of Cd (0.05 µg Cd l^{-1}), 30 nM of Cu (2.0 µg Cu l^{-1}), 5.5 nM of Pb (1.1 µg Pb l^{-1}), and 220 nM of Zn (14 µg Zn l^{-1}). Trace metal concentrations added to the replicates of condition H were determined in order to mimic the concentrations measured in the sediment elutriates. The 9 bottles were immediately incubated for 27 days in the phytotron using the same conditions as described in section III.2.3.3.

As previously described, composite samples were collected at the beginning and the end of the incubation for analysis of total and dissolved trace metal concentrations, DOC/TN, and NO_3^-. Samples for flow cytometry analysis (10 mL) were collected from each replicate at the beginning and after 1, 2, 4, 6, 8, 11, 14, 21, and 27 days and immediately analyzed.

III.2.3.5. Chemical analyses

Dissolved organic carbon (DOC) and total nitrogen (TN) concentrations were determined using a TOC-V_{CSH} analyzer (Shimadzu) with an accuracy of 0.1 mg C L^{-1} (Dang, Lenoble, *et al.*, 2014). The DOC and TN analyses were validated using certified reference materials (MISSIPPI-03 Environment Canada).

Nitrate (NO_3^-) concentrations were determined using an Autoanalyzer II (Technicon™) with an accuracy of 0.1 µmol N-NO_3^- L^{-1} (6.2 µg NO_3^- L^{-1}) (Treguer and La Corre, 1974). Phosphate (PO_4^{3-}) concentrations were analyzed using a UV 1800 Shimadzu

Spectrophotometer and macro cell Quartz SUPRASIL®, 50-mm light path (Hellma Analytics), based on the (Murphy and Riley, 1962) molybdenum blue colorimetric method.

Differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) was used to measure Cd, Cu, Pb, and Zn dissolved and total concentrations. Measurements were performed on a fully automated system based on a homemade autosampler (developed in our laboratory) and five Cavro XE 1000 syringe pumps for standard additions, an Autoballl (EcoChemie) potentiostat, and a VA663 (Metrohm) mercury drop electrode, controlled by GPES 4.9 software (EcoChemie). Details about instruments, analysis conditions, and data treatment are provided elsewhere (Oursel *et al.*, 2013; Cindrić *et al.*, 2015).

III.2.3.6. Microbial community characterization

Enumeration and characterization of the ultraphytoplanktonic community were performed by flow cytometry using a BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) with a blue excitation wavelength (488 nm). Each cell was characterized by two diffraction parameters (forward scatter (FSC), linked to cell size, and side scatter (SSC), linked to cell internal structure). Two fluorescence intensities were also considered, with emissions in the orange and red wavelength ranges. Beads (Fluoresbrite® YG Microspheres 2.0 µm, Polysciences Inc.) were used as a size standard. Subsequently, 500 µL were run at a flow rate of 60 µL min^{-1} and four ultraphytoplanktonic groups were discriminated based on their size, internal structure, and autofluorescence (Vaulot *et al.*, 1989; Grégori *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 2014). Data were acquired using BD Accuri CFlow Plus software and abundances of each group were expressed as number of cells per mL (cell mL^{-1}).

III.2.3.7. Statistical analysis

Contour map representations used to illustrate spatial variations of the field datasets were established with Surfer software (9.0 version); the Kriging algorithm was applied as the interpolation method. The deciles of the concentration range obtained for each metal element or of the abundance of each ultraphytoplanktonic community were used as scales for a better comparison of distribution maps.

All statistical analyses were performed with RStudio (R Core Team, 2017) (packages CCA, Hmisc, stats, and Vegan). Correlations between variables and parameters measured for the mappings were assessed by the non-parametric Spearman's rank correlation test. To determine the relative contributions of environmental parameters to the spatial structuring of the ultraphytoplanktonic community, redundancy analysis (RDA) and variation partitioning by RDA were performed. Covariance analysis and constrained ordination were used to select a subset of explanatory variables from the set of all available variables and to keep the variation explained by these variables to a maximum. To investigate differences in parameters among experimental treatments and exposure times, analyses of variance (ANOVA) were used. Where ANOVA revealed significant differences (*p-value* < 0.05), Tukey's HSD *post hoc* comparison tests were performed to determine where significant differences occurred. Analysis of similarities (ANOSIM) and cluster analysis were done using Bray-Curtis dissimilarity matrix from abundance data to evaluate the similarity of the ultraphytoplankton community structure between the different conditions.

III.2.4. Results

III.2.4.1. Meteorological data and abiotic characterization of the surface seawater

Overall, monthly average temperature varied from 11.3 to 24.5°C in 2014 and from 9.6 to 27.2°C in 2015 (Figure A- 1). Monthly average temperature was higher in February 2014 (11.5°C) than in February 2015 (9.6°C). Annual cumulated precipitation was significantly higher in 2014 (1,048 mm) than in 2015 (479 mm), with a 15-year average of 585 mm. However, the sampling campaign of February 2015 was preceded by a rain period of three days, while no rainfall event was observed during the six days preceding the sampling campaign in 2014 (Figure A- 2).

In February 2015, average surface water temperature was 12.7 ± 0.8°C, with lowest values recorded in the northwestern part of the bay (Figure A- 3). Surface water salinity ranged from 34.6 to 38.3 in the entire bay (Figure A- 3). Two sites near the mouth of the Las River, a small coastal river situated in the north of the little bay, were characterized by low surface water salinity values (27.6 and 27.9) (Figure III-1). Average pH was 8.1 ± 0.1 and oxygen

saturation was 102 ± 6%. Both pH and oxygen saturation were uniform throughout the entire bay.

Nitrate (NO_3^-) concentrations varied from 0.009 to 4.7 mg N L^{-1} in 2014 (Figure A- 4) and from 0.005 to 0.87 mg N L^{-1} in 2015 (Figure A- 4), corresponding to 170- and 140-fold enrichments, respectively. The highest values were recorded in the northern part of Toulon Bay, the most anthropized area, and a rapid decrease toward the open sea was observed. Relatively low phosphate (P-PO_4^{3-}) concentrations were observed, with values below 0.33 mg P L^{-1} in 2015 (Figure A- 4). Three sites, near to the civil harbor of Toulon, were characterized by higher phosphate concentrations, ranging from 0.62 to 1.03 mg P L^{-1}. Finally, for both years, relatively low and similar dissolved organic carbon (DOC) concentrations were observed throughout the entire bay (1.03 ± 0.16 mg C L^{-1}), as already described in (Dang, Tessier, *et al.*, 2014) (Figure A- 3 and Figure A- 4).

The surface water of Toulon Bay also presented significant gradients of trace metal concentrations in both 2014 and 2015. For all metals studied (*i.e.* Cd, Cu, Pb, and Zn), concentrations were lower in the southeast of LaB and gradually increased toward the northwest, the most anthropized area (Figure A- 4). Dissolved Cd, Cu, and Zn concentrations were similar to total concentrations (data not shown), while dissolved Pb concentration was lower than the total concentration due to its higher affinity to particles (data not shown). However, in a previous study, the dissolved-total relation for Pb was stable throughout the entire bay, irrespective of the year (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). Therefore, only dissolved trace metal concentrations will be considered in the following sections. In 2014, strong enrichments, calculated from the minimal concentration measured in the bay, were observed for dissolved Cd, Cu, Pb, and Zn, ranging from 8 to 40-fold enrichment factors. In 2015, the enrichment factors observed were higher than in 2014, ranging from 25 to 190-fold, except for Cd, which presented no significant contamination gradient.

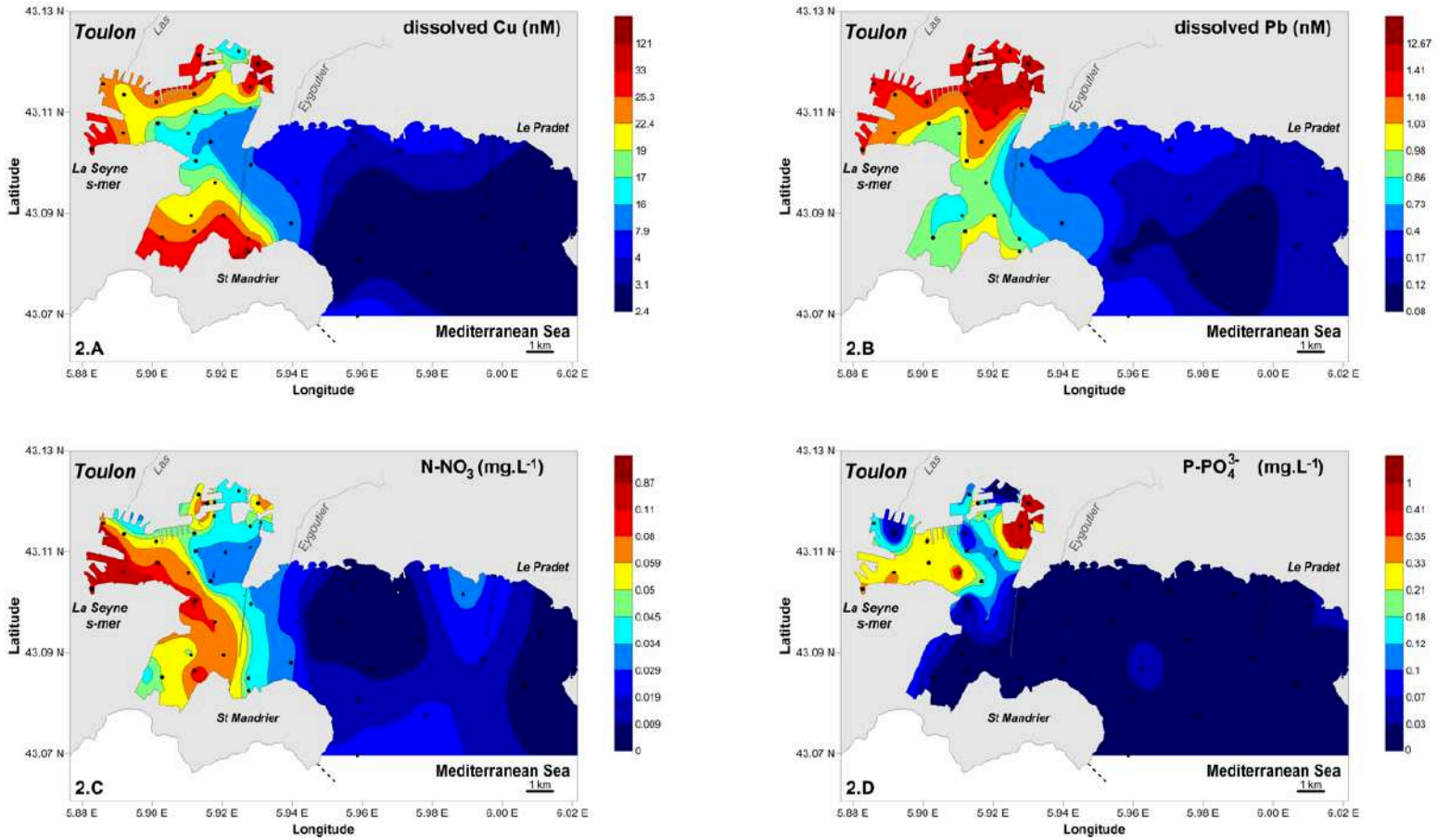


Figure III-2 Abiotic parameters spatial variations in surface seawater of Toulon Bay in February 2015. A: Cu, B: Pb, C: N-NO_3^-, D: P-PO_4^{3-}. Colour scales were drawn according to deciles of the respective datasets. For each parameter, the smallest and highest numbers of the colour scale represented the smallest and highest values measured, respectively.

III.2.4.2. Microbial community abundance and structure

Four ultraphytoplanktonic groups were considered in this study. Cells with low red fluorescence, low orange fluorescence, small size (< 2 µm), and low granularity were classified as *Prochlorococcus*-like cyanobacteria (*PRO)*. A *Synechococcus*-like (*SYN*) cyanobacterial group was discriminated by its small size (< 2 µm), low granularity, and high orange fluorescence (phycoerythrin-rich cells). A group of photosynthetic picoeukaryotes (*P-Eu*) exhibited intermediate to high red fluorescence, no orange fluorescence, and higher granularity and size than *PRO* and *SYN* (still < 2µm). Additionally, a eukaryotic nanophytoplanktonic group (*N-Eu*) was spotted by its larger size (> 2 µm), higher granularity, and high red fluorescence intensity (Vaulot *et al.*, 1989; Grégori *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 2014).

For both February 2014 and February 2015, total abundance of ultraphytoplankton appeared similar throughout the entire bay, with low spatial and temporal variability (2.4 ± 0.6 × 10^4 cells mL^{-1} in 2014 and 1.7 ± 0.3 × 10^4 cells mL^{-1} in 2015). Distributions of each ultraphytoplanktonic groups are presented in Figure III-3 for 2015 and in supplementary information for 2014 (Figure A- 5). In 2014 and 2015, *PRO* was the least abundant group (1.3 ± 0.8 × 10^3 cells mL^{-1} and 7.1 ± 3.9 × 10^2 cells mL^{-1}, respectively) and presented either a low amplitude distribution gradient (in 2014) or a patchy distribution (2015). In 2014, *N-Eu* had a low abundance, but presented a strong distribution gradient with higher abundance in LiB (2.5 ± 0.5 × 10^3 cells mL^{-1}) and was progressively less abundant towards the open sea through LaB (1.6 ± 1.0 × 10^3 cells mL^{-1}). Conversely, in 2015, *N-Eu* presented a rather homogeneous distribution (9.3 ± 2.8 × 10^2 cells mL^{-1}). In both years, *P-Eu* presented a strong distribution gradient between the two parts of the bay, with the highest abundances recorded for LiB (1.8 ± 0.3 × 10^4 cells mL^{-1} in 2014 and 1.4 ± 0.2 × 10^4 cells mL^{-1} in 2015) and a gradual decrease through LaB to reach a minimum of 1.1 ± 0.7 × 10^4 cells mL^{-1} in 2014 and 1.0 ± 0.3 × 10^2 cells mL^{-1} in 2015. The group *SYN* presented the most significant distribution gradient. Conversely to what was observed for *P-Eu*, the highest *SYN* abundances were recorded in LaB (9.0 ± 3.5 × 10^3 cells mL^{-1} in 2014 and 5.3 ± 3.1 × 10^3 cells mL^{-1} in 2015) and decreased progressively towards the most anthropized sites in LiB, reaching the lowest abundances of 3.7 ± 0.8 × 10^3 cells mL^{-1} in 2014 and 1.8 ± 1.4 × 10^3 cells mL^{-1} in 2015. For both years, *SYN* distribution was negatively correlated with *P-Eu* distribution (n = 41 for 2014 and n = 43 for 2015; $\rho < -0.60$; *p-value* < 0.01). These distribution gradients resulted in a major shift in community structure

from a *P-Eu* dominated community in the most anthropized areas to a *SYN* dominated or a *P-Eu* and *SYN* co-dominated community towards the open sea.

III.2.4.3. Relationships between ultraphytoplankton community characteristics and environmental parameters

In 2015, *SYN* abundance was significantly and positively correlated with temperature, salinity, and pH (n = 43; ρ > 0.41, *p-value* < 0.01). For both years, *SYN* was significantly and negatively correlated with Cd, Cu, Pb, and Zn concentrations (n = 41 for 2014 and n = 43 for 2015; ρ < -0.52; *p-value* < 0.01), along with NO_3^- concentrations (n = 41 for 2014 and n = 43 for 2015; ρ < -0.39; *p-value* < 0.01). Conversely, *P-Eu* was positively correlated with all trace metals (n = 41 for 2014 and n = 43 for 2015; ρ > 0.36; *p-value* < 0.01) for both years, while *P-Eu* was positively correlated with NO_3^- in 2015 (n = 43; ρ = 0.62; *p-value* < 0.01). In 2014, *N-Eu* was positively correlated with Pb and Cd (n = 41; ρ > 0.30; *p-value* < 0.01) and negatively correlated with NO_3^- (n = 41; ρ = -0.33; *p-value* < 0.01), while in 2015, *N-Eu* showed significant positive correlations with all trace metals (n = 43; ρ > 0.54; *p-value* < 0.01) and NO_3^- (n = 43; ρ = 0.49; *p-value* < 0.01). Finally, *PRO* was solely positively correlated with Pb (n = 41; ρ = 0.69; *p-value* < 0.01) in 2014 and did not present any correlation with environmental variables in 2015. No significant correlation was observed between PO_4^{3-} and all the biological groups studied.

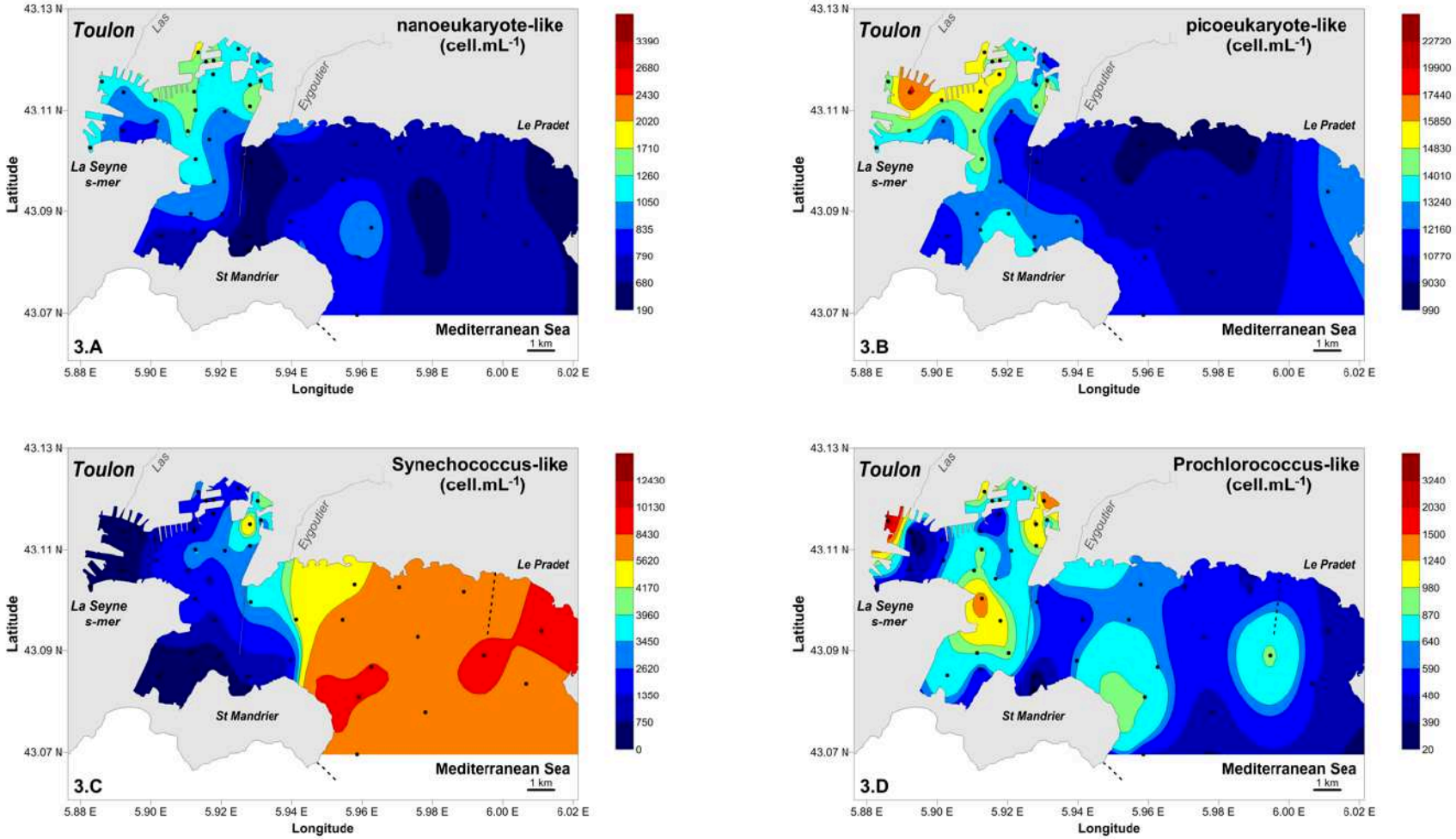


Figure III-3 Spatial distributions of ultraphytoplanktonic groups in surface seawater of Toulon bay in February 2015, calculated from flow cytometry data. A: N-Eu,B: P-Eu,C: SYN, D: PRO. Values are expressed in cell mL^{-1}. Scales were drawn according to deciles of the respective datasets.

The RDA analysis on the 2015 dataset was performed using all environmental and chemical variables except Cd and Zn concentrations, which showed redundancy with the Pb and Cu concentrations, respectively (permutation tests in constrained ordination, *p-value* < *0.01*) and were thus not included in the analysis. The two principal components significantly explained 82.9% of the total dataset variance (ANOVA for redundancy analysis; *p-value* < 0.01). The environmental and chemical parameters divided the stations into two significantly distinct clusters, corresponding to LiB and LaB (Figure III-4). On the one hand, the LiB samples appeared related to elevated NO_3^-, Cu, and Pb concentrations as well as to elevated *P-EU* abundances. On the other hand, most of the LaB samples were distinct from others due to higher temperatures and *SYN* abundances. Variation partitioning among the explained variance of ultraphytoplankton structure demonstrated that Cu and Pb contributed up to 58.4% (including interactions with other variables), whereas other abiotic parameters did not contribute to more than 34.7% (interaction included) in the structure shifts observed. Similarly, in February 2014, Cu and Pb explained the largest proportion of the total variance of the ultraphytoplankton structure, up to 46.8% of the 65.4% significantly explained by the variable dataset (data not shown).

Considering, on the one hand, the major and recurrent concentration gradients of Cu, Pb, Zn, and NO_3^- and, on the other hand, their specific statistical relationships with the ultraphytoplankton structure, the following incubation experiments were designed to evaluate their respective impacts on ultraphytoplankton.

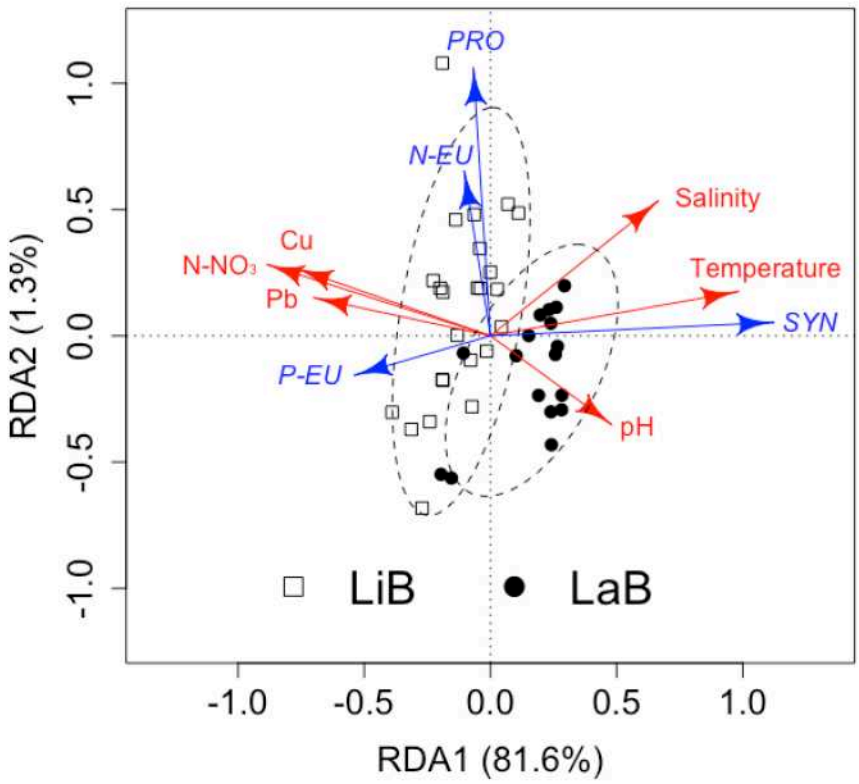


Figure III-4 Relationships between environmental variables, contaminants, nutrients and ultraphytoplanktonic communities for surface seawater samples in February 2015. RDA ordination describes the relationship between the environmental variables (pH, Salinity and Temperature), NO_3^-, the chemical contaminants (Cu and Pb) and the ultraphytoplanktonic communities. Dotted circles gather similar samples (Confidence interval >0.95). Empty square: LaB, filled circle: LiB.

III.2.4.4. DOC, nutrient, and trace metal concentrations in incubation experiments

Initial water samples used for the water incubation experiment were geochemically contrasted, with higher trace metal concentrations in MIS than in 41p (factor 1.7 for Cd, 6.2 for Cu, and 3.5 for Pb) (Tableau III-1, Tableau A- 1). The TN and N-NO_3^- concentrations were also higher in MIS than in 41p (factor 9.3 and 9, respectively) (Tableau III-1, Tableau A- 1). On the other hand, DOC concentration was similar in both water samples, as observed during on-field campaigns (Tableau III-1, Tableau A- 1). Such differences between MIS and 41p samples were already observed during the field campaigns of February 2014 and 2015.

For sediment elutriate incubation, initial water samples were even more geochemically contrasted, with higher metal (factors 2 for Cd, 41 for Cu, 9.2 for Pb, and 19 for Zn), TN (factor 20), and N-NO_3^- concentrations (factor 53) (Tableau III-1, Tableau A- 1). The DOC concentrations were again similar in both sites. Moreover, 24-h resuspension of surface sediments from MIS have released Cd, Pb, and Zn in the elutriate (factors 3, 4, and 1.2, respectively), while both Cu and TN concentrations were lower in the elutriate than in the MIS sample, as observed previously (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015) (Tableau III-1, Tableau A- 1). Sediment resuspension thus resulted in a different geochemical signature compared to that of the initial contaminated water. The DOC concentration was similar between initial MIS water sample and elutriate.

Trace metal concentrations measured in conditions A and E were similar to the ones encountered in initial water samples from 41p and MIS, respectively (Tableau III-1, Tableau A-1). As expected, trace metal concentrations in condition D corresponded to the average between the levels measured in 41p and MIS initial water samples. Trace metal concentrations were similar in conditions B and C, corresponding to the artificial trace metal contamination, and exceed the levels encountered in MIS initial water samples (Tableau III-1, Tableau A- 1).

Trace metal concentrations measured in condition F were similar to the ones of the 41p initial water samples. Levels in condition G and H corresponded to the average between the levels measured in 41p and elutriate initial water samples. Metal concentrations measured at the beginning and at the end of each condition were similar, attesting that the expected trace metal levels remained constant during the entire experiment due to the material quality used, avoiding metal contamination or removal (Tableau III-1, Tableau A- 1).

Tableau III-1 Concentration of chemical characteristics for sampling seawater and average concentration between the beginning and the end of both water mixing incubation and sediment elutriate incubation for each condition.

Incubation	Condition	Mixture	DOC (mg C L^{-1})	TN (mg N L^{-1})	N-NO_3^- (mg N L^{-1})	Dissolved Cd (nM)	Dissolved Cu (nM)	Dissolved Pb (nM)	Dissolved Zn (nM)*
Water incubation	41p		0.97 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	4.3 ± 0.4	0.24 ± 0.03	NA
	MIS		0.94 ± 0.06	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.10 ± 0.02	27 ± 1.4	0.83 ± 0.06	NA
	A	41p / 41p	1.6 ± 0.5	0.80 ± 0.35	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01	4.4 ± 0.1	0.26 ± 0.02	NA
	B	41p / 41p + Metals	1.4 ± 0.4	0.53 ± 0.29	0.22 ± 0.11	0.14 ± 0.03	40 ± 6	3.1 ± 0.2	NA
	C	41p / 41p + Metals + NO_3^-	1.6 ± 0.4	1.2 ± 0.2	0.54 ± 0.04	0.08 ± 0.01	40 ± 2	3.02 ± 0.35	NA
	D	41p / MIS	1.4 ± 0.5	0.52 ± 0.23	0.16 ± 0.04	0.09 ± 0.01	13 ± 4	0.65 ± 0.16	NA
	E	MIS / MIS	1.6 ± 0.4	0.64 ± 0.21	0.26 ± 0.04	0.10 ± 0.01	22 ± 3	0.90 ± 0.17	NA
Sediment elutriate incubation	41p		1.00 ± 0.02	0.06 ± 0.01	< DL	0.06 ± 0.01	3.2 ± 0.2	0.14 ± 0.01	8.8 ± 0.5
	MIS		0.97 ± 0.02	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.12 ± 0.04	131 ± 18	1.3 ± 0.1	170 ± 10
	Elutriate		0.95 ± 0.02	1.1 ± 0.1	0.87 ± 0.01	0.36 ± 0.04	30 ± 2	5.3 ± 0.6	208 ± 15
	F	41p / 41p	1.0 ± 0.2	0.23 ± 0.17	< DL	0.07 ± 0.01	3.1 ± 0.1	0.10 ± 0.02	7.0 ± 1.7
	G	41p / Elutriate	1.6 ± 1.0	0.66 ± 0.23	0.24 ± 0.28	0.28 ± 0.04	17 ± 1	2.5 ± 0.4	125 ± 5.
	H	41p / 41p + Metals	1.1 ± 0.3	0.39 ± 0.12	0.15 ± 0.18	0.32 ± 0.08	19 ± 4	3.3 ± 07	124 ± 8

III.2.4.5. Ultraphytoplankton abundance dynamics in incubation experiments

In control condition A, total ultraphytoplankton abundance increased regularly and more than 12-fold along the 24 days of incubation, from $6.8 \pm 1.9 \times 10^3$ to $8.9 \pm 2.7 \times 10^4$ cells mL^{-1} (Figure III-5A). This increase was mainly due to *SYN* (17-fold increase) (Figure III-5B) and, to a lesser extent, to *N-Eu* (5-fold increase) (Figure III-5C), *P-EU* (2-fold increase) (Figure III-5D), and *PRO* (1.4-fold increase) (Figure III-5E). In condition B (trace metals addition) and C (metals and NO_3^- addition), the dynamics of total ultraphytoplankton was different from that in condition A (Figure III-5A). Indeed, a strong decrease of abundance was observed during the first six days of the experiment, reaching only 1% of initial abundance. From the 6th day to the end of the experiment, the community recovered back to the initial abundance levels (ANOVA; *p-value* > 0.05). Each ultraphytoplanktonic group followed the same global abundance dynamics in both conditions, the main differences occurring during the recovery phase with a most efficient growth for *P-Eu* (236- and 159-fold abundance increase in conditions B and C, respectively; Figure III-5B to E). In condition D (contaminated water addition), the total ultraphytoplankton community demonstrated an abundance dynamic very similar to that of condition A, with a regular increase higher than 11-fold along the 24 days of incubation (Figure III-5A). However, the different phytoplanktonic groups behaved differently than in condition A, with a final slightly lower increase of *SYN* and a significant increase of *N-Eu* (Figure III-5B and C) Finally, in condition E (contaminated control), the dynamics of the total ultraphytoplankton community followed the dynamics observed in conditions A and D, but resulted in a significantly lower final abundance that was not significantly different from the initial abundance (ANOVA; *p-value* > 0.05). The abundances of *SYN, PRO, P-Eu,* and *N-Eu* all experienced original temporal dynamics, but ended at similar abundance levels than at the beginning of the experiment (ANOVA; *p-value* > 0.05).

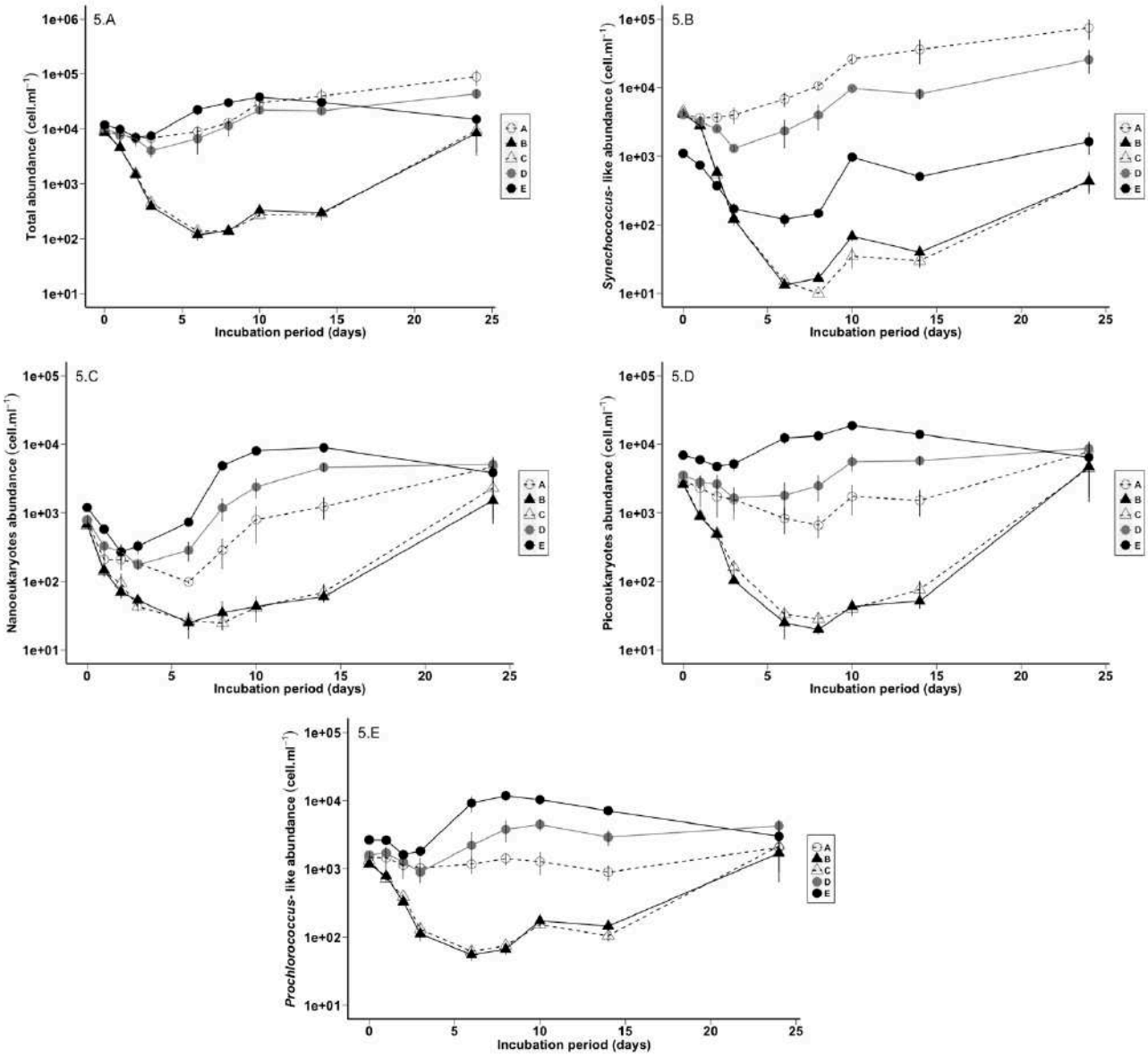
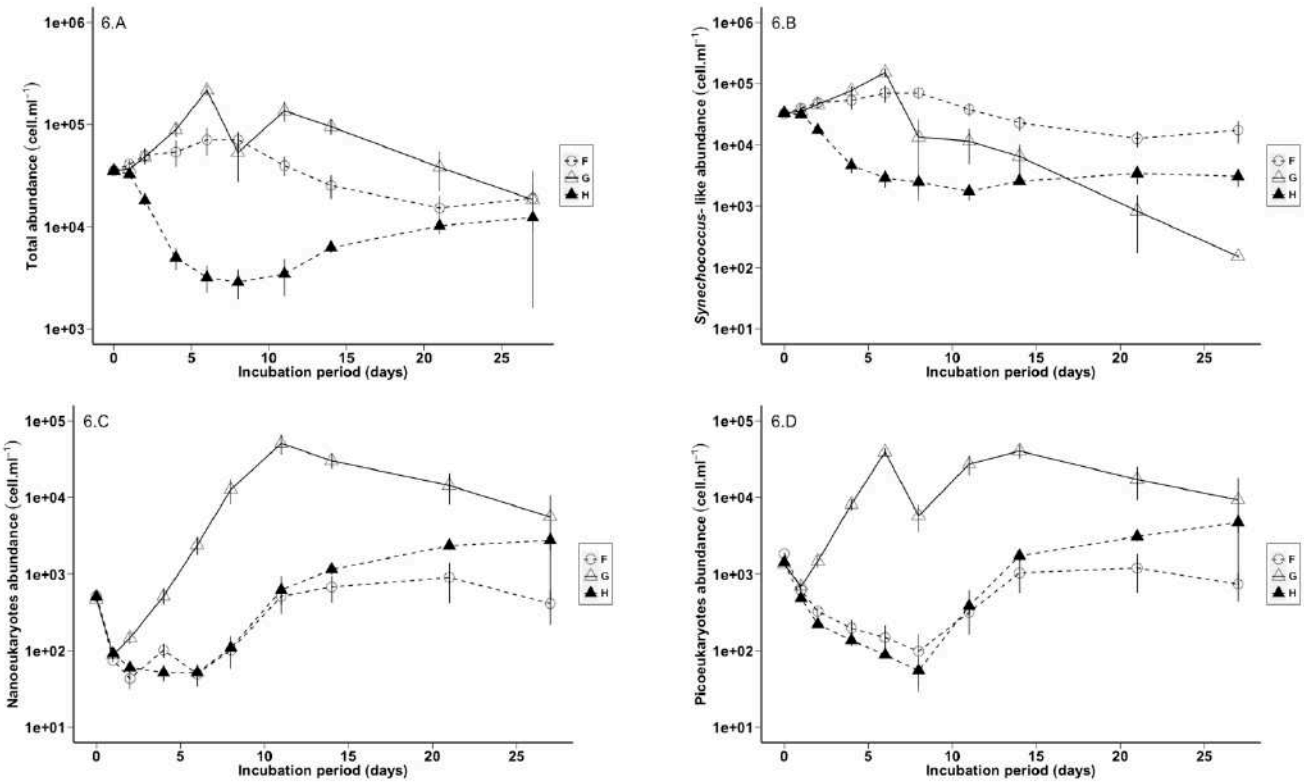


Figure III-5 Ultraphytoplankton abundance dynamics during the water incubation experiment. (A) Total abundance of ultraphytoplankton, (B) SYN, (C) N-Eu, (D) P-Eu and (E) PRO. Condition A represents uncontaminated control, B, trace metal addition, C, trace metals and nitrate addition, D, mixing uncontaminated with contaminated water and E, contaminated control. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively

In condition F (uncontaminated control), the total ultraphytoplankton community exhibited small abundance variations along the 27 days of incubation (Figure III-6A). While the dominant phytoplanktonic group, *SYN*, and the group *PRO* presented similar temporal dynamics, the other two groups showed a strong decrease in the first days of the experiment before increasing to reach final abundances close to their initial ones (Figure III-6B to E). In

condition G (elutriate addition), total abundance of ultraphytoplankton appeared to be higher and its dynamics was different than in the control, with a significant increase (6-fold) during the first 11 days of the experiment and a gradual decrease until the end of the experiment, back to a similar abundance than at the beginning of the experiment (Figure III-6A). Regarding the specific dynamics of the four phytoplanktonic groups, while each of them benefited temporarily from the elutriate, the initially dominant *SYN* finally encountered a large drop of three orders of magnitude by the end of the experiment (Figure III-6B to E). In condition H (trace metal addition), total ultraphytoplankton abundance presented a different dynamic than those of conditions F and G, but appeared similar to the variations observed in conditions B and C (trace metal addition) from the water incubation experiment. Indeed, a major decrease was observed during the first eight days, down to 13% of the initial abundance, and was followed by a gradual recovery up to 35% of the initial abundance (Figure III-6A). Group *SYN*, the most abundant phytoplanktonic group, followed similar dynamics and appeared to be the only group whose dynamics significantly different from that of the control condition.



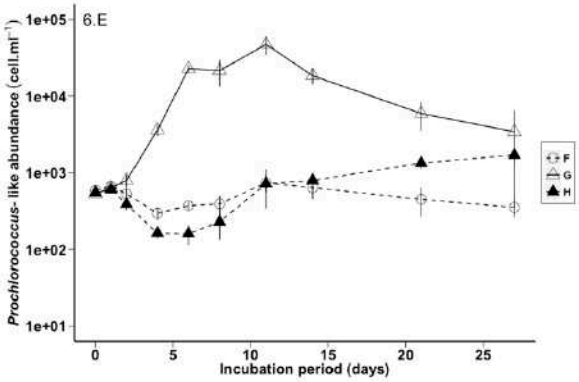


Figure III-6 Ultraphytoplankton abundance dynamics during the sediment elutriate incubation experiment. (A) Total abundance of ultraphytoplankton, (B) SYN, (C) N-Eu, (D) P-Eu and (E) PRO. F represents uncontaminated control, G, elutriate addition and H, metal addition. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively.

III.2.4.6. Ultraphytoplankton community structure under experimental conditions

At the beginning of the water incubation, conditions A (uncontaminated control), B (trace metals addition), C (both metals and NO_3^- addition), and D (contaminated water addition) were similar, with a co-dominance of *SYN* (from 41.5 ± 2.4% to 48.4 ± 1.9%) and *P-Eu* (from 30.2 ± 1.2% to 35.1 ± 0.7%) (Figure III-7). In contrast, condition E (contaminated control) was different from the other conditions, with a dominance of *P-Eu* (58.4 ± 1.0%) and, to a lesser extent, *PRO* (22.3 ± 0.6%) (Figure III-7). At the end of the experiment, in condition A, the *SYN* population was largely dominant, contributing to 82.4 ± 6.8% of the total community (Figure III-7). In conditions B and C, *SYN* was the least abundant group, with 6.5 ± 1.2% and 9.5 ± 3.8%, respectively, while *P-Eu* dominated the community (50.9 ± 5.1% and 45.8 ± 1.9%) (Figure III-7). In condition D, *SYN* was dominant, representing 55.8 ± 13.3% of the ultraphytoplankton; relative abundance of *P-Eu* was lowered to 21.5 ± 7.2% (Figure III-7). Finally, in condition E, *P-Eu* dominated, similar to the beginning of the experiment (Figure III-7). The cluster analysis performed to compare the different experimental conditions based on their respective ultraphytoplankton community structures showed high similarities (> 82%) between conditions A, B, C, and D at the beginning of the water mixing experiment, corresponding to a *SYN/P-Eu* co-dominated community (ANOSIM, *p-value > 0.05*) (Figure III-8A). The ultraphytoplankton community structure in condition E at the beginning of the experiment appeared distant from that of the other conditions (similarity < 13%), with a *P-Eu* dominated

community (ANOSIM, *p-value < 0.01*). The large distance between the beginning and the end of the experiment for conditions B, C, and D (< 20%) confirmed the major structuring effect of trace metal addition or contaminated water. Moreover, the high similarity observed at the end of the experiment for conditions B, C, and E demonstrated that trace metal addition could lead to a final structure highly resembling that observed in the most contaminated part of Toulon Bay.

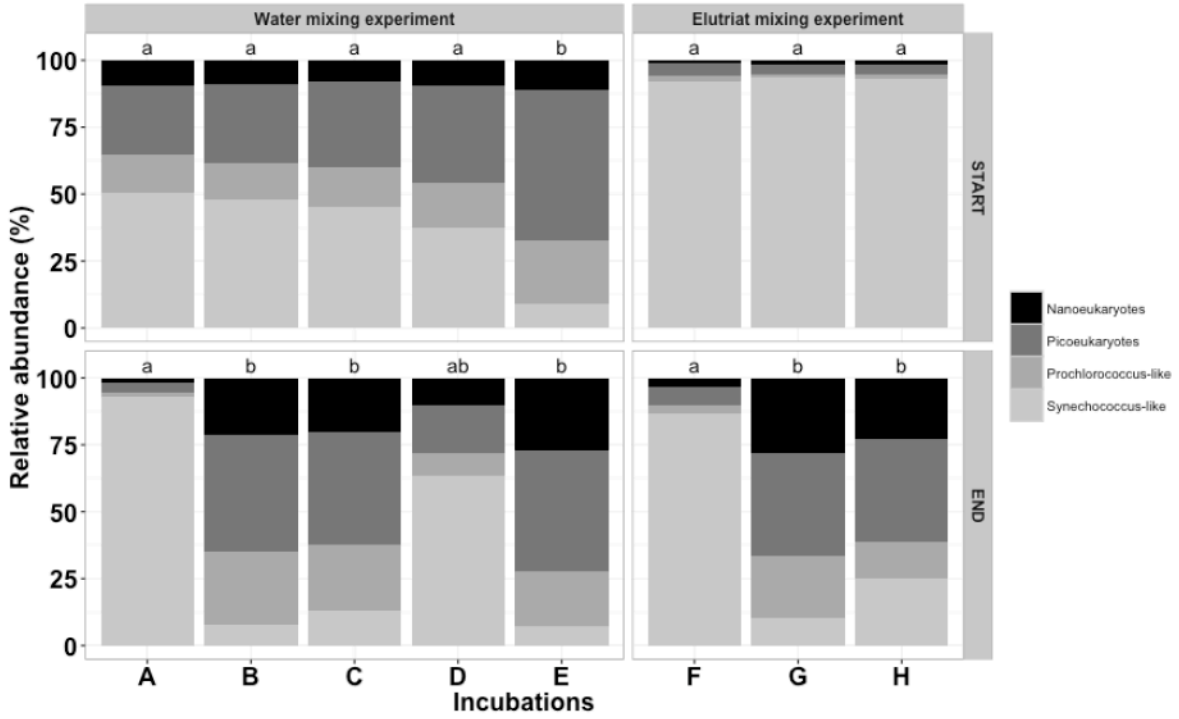
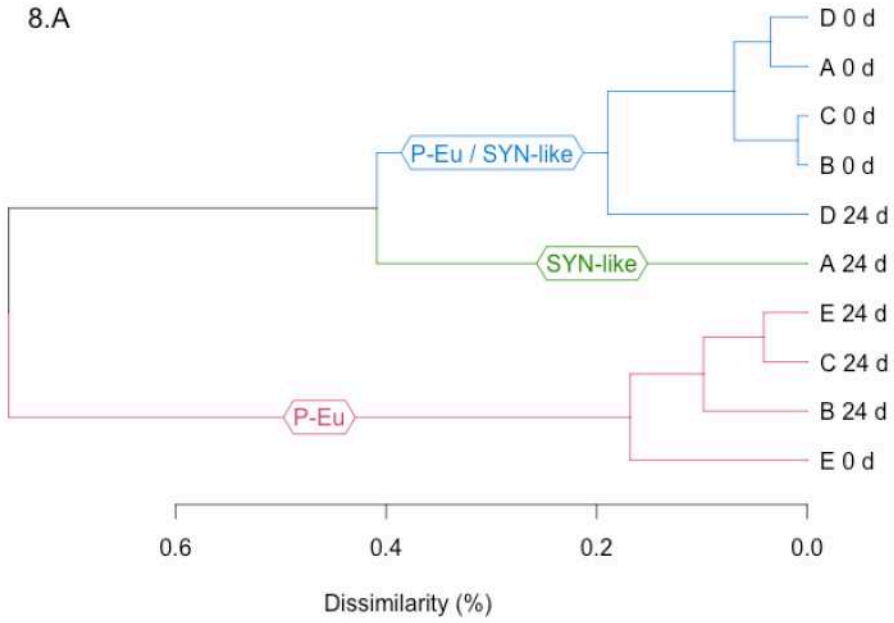


Figure III-7 Ultraphytoplankton community structure at the beginning and the end of both water and sediment elutriate incubation experiments. A represents uncontaminated control, B, trace metal addition, C, trace metals and nitrate addition, D, mixing uncontaminated with contaminated water and E, contaminated control for water incubation and F represents uncontaminated control, G, elutriate addition and H, metal addition for elutriate incubation. Different lower-case letters indicate significant difference between compared community structures for each incubation.

At the beginning of the sediment elutriate incubation, conditions F (uncontaminated control), G (elutriate mixing), and H (trace metals addition) were similar, with a strong dominance of *SYN* (from 91.7 ± 0.3% to 93.4 ± 0.1%) (Figure III-7). At the end of the experiment, condition F was similar to the initial conditions, with a strong dominance of *SYN* (89.8 ± 3.7%) (Figure III-7). In condition G, *P-Eu* (38.8 ± 3.1%) and, to a lesser extent, *PRO* (23

± 0.8%) and *N-EU* (22.6 ± 2.2%) were the most abundant groups, while *SYN* was the least abundant group (Figure III-7). In condition H, *P-Eu* (44.1 ± 3.7%) and, to a lesser extent, *SYN* (24.6 ± 5.9%) and *N-EU* (28.8 ± 0.8%) were the most abundant groups, while *PRO* was the least abundant group (Figure III-7). The cluster analysis performed on ultraphytoplankton structure based on relative abundance of each group showed high similarities (> 95%) between conditions F, G, and H at the beginning of the incubation (ANOSIM, *p-value* > 0.05) (Figure III-8B). The high distance between the beginning and the end of the experiment for both conditions G and H (< 20%) confirmed the major and highly similar structuring effect of elutriate mixing and artificial trace metal addition.



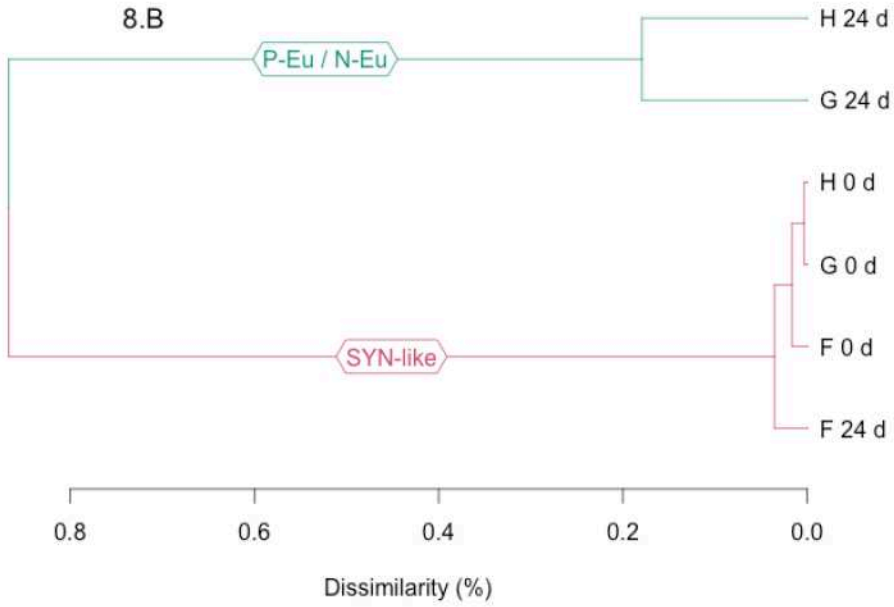


Figure III-8 Hierarchical clustering of ultraphytoplankton communities of incubation at the beginning ("START") and the end ("END") of both water (A) and sediment elutriate (B) incubations. A represents uncontaminated control, B, trace metal addition, C, trace metals and nitrate addition, D, mixing uncontaminated with contaminated water and E, contaminated control for water incubation and F represents uncontaminated control, G, elutriate addition and H, metal addition for elutriate incubation SYN-like (Synechococcus-like) and P-Eu/N-Eu (picoeukaryote-like/nanoeukaryote-like) indicate the dominant group(s) for each condition and date. Scale indicates percent dissimilarity based on Bray-Curtis distances matrix.

III.2.5. Discussion

III.2.5.1. Chemical contamination of surface water in Toulon Bay

The mapping of dissolved Cd, Cu, Pb, and Zn concentrations during two consecutive years in surface seawater of the Toulon Bay showed multiple trace metal contamination gradients, with a maximum contamination recorded in the northern part of the little bay. These gradients ranged from extremely low concentrations, close to the geochemical background of the Mediterranean Sea (Tankere and Statham, 1996; Morley *et al.*, 1997; Sohrin and Bruland, 2011), to extremely high concentrations (25-fold to 190-fold enrichments) in the most polluted sites. When compared with the mean trace metal concentrations observed in the

open Mediterranean Sea (Tankere and Statham, 1996; Morley *et al.*, 1997), the maximum concentrations encountered in the north of the LiB showed slight Cd contamination (5-fold enrichment), but high levels for Cu, Pb, and Zn (maximum enrichments of 42-, 198-, and 256-fold, respectively), demonstrating significant anthropogenic inputs and strong multi-contamination, as previously evidenced (Jean *et al.*, 2012; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). The originality of the Toulon Bay resides in the gradual contamination gradient from the northwestern enclaves to the southeastern opening on the sea, along several kilometers, contrasting with most of other study sites that present more spatially limited gradients. This gradual gradient probably results from moderate transport rates by water currents and maritime traffic because of the semi-enclosed characteristics of this system, as proposed previously to explain both water and sediment contamination gradients (Tessier *et al.*, 2011; Dufresne *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Misson *et al.*, 2016). Maximum trace metal levels in the Toulon Bay were located in French Navy enclaves as well as civil harbors (Toulon and La Seyne-Sur-Mer). Numerous anthropogenic sources related to large boat traffic, harbor activities, and antifouling paints are responsible for significant metal contamination of seawater (Turner, 2010; Cindrić *et al.*, 2015). Previous studies have also ascribed the metal contamination of Toulon Bay mainly to historical contamination corresponding to the 2nd World War, which has resulted in a large stock of pollutants in the surface sediment (Tessier *et al.*, 2011; D. Cossa *et al.*, 2014; Dang, Tessier, *et al.*, 2014; Pougnet *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015). The impacts of contaminated sediment on the water column due to resuspension and remobilization processes have already been demonstrated for Toulon Bay sediments (Dang, Lenoble, *et al.*, 2015) and sediments from other areas (Saulnier and Mucci, 2000; Zoumis *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006; Tankere-Muller *et al.*, 2007; Kalnejais *et al.*, 2010).

Contrary to what is often observed in similar ecosystems, the nutrients did not systematically present a strong gradient, but rather a patchy distribution, conversely to that of trace metals (Paerl *et al.*, 2010; Garcia and Bonel, 2014; Salem *et al.*, 2015). Indeed, the highest concentrations we measured corresponded to less than 10 sampling sites, and the gradient we observed was thus far less gradual than for trace metals. Moreover, on the one hand, NO_3^- concentrations measured in the most polluted zone of Toulon Bay appeared high in comparison with those reported in the Mediterranean Sea in previous studies (Lafabrie *et al.*, 2013; Painter *et al.*, 2014; Thyssen *et al.*, 2014). On the other hand, the PO_4^{3-} concentrations we observed in Toulon Bay were in the same order of magnitude than

described in previous studies performed in the Mediterranean Sea (Lafabrie *et al.*, 2013; Painter *et al.*, 2014; Thyssen *et al.*, 2014), *i.e.* globally low concentrations. These contrasted enrichments in NO_3^- and PO_4^{3-} resulted in relatively high N: P ratios and suggest P-limitation in Toulon Bay, as previously demonstrated throughout the Mediterranean Sea (Thingstad *et al.*, 1998; Moutin and Raimbault, 2002; Krom *et al.*, 2010; Siokou-Frangou *et al.*, 2010; Mella-Flores *et al.*, 2011; The Mermex Group *et al.*, 2011; Bogé *et al.*, 2012). Since such strong trace metal gradients, but weaker nutrient enrichment of coastal waters, appear singular, it raises the question of the impact on planktonic communities.

III.2.5.2. Relationships between ultraphytoplanktonic community and chemical gradients

Parallel to the chemical contamination gradient observed in Toulon Bay, a strong gradient of the ultraphytoplanktonic community structure was evidenced, with the most contaminated areas being dominated by *P-Eu* and the opening the open sea being dominated by *SYN*. Such spatial gradients in the ultraphytoplankton community structure have previously been reported in different coastal ecosystems, ranging from lagoons to open shorelines (*e.g.* Bonato *et al.*, 2015, 2016), especially in the Mediterranean Sea (Casotti *et al.*, 2003; Estrada *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2005; Bec *et al.*, 2011). In spite of these spatial variations in community structure, total abundance of the ultraphytoplanktonic community was relatively constant in the entire bay ($1.8 \pm 0.2 \times 10^4$ cells mL^{-1}), similar to the findings of numerous studies in Mediterranean coastal areas (Estrada *et al.*, 2004; Bec *et al.*, 2011; Ben Othman *et al.*, 2017). Taken together, these observations suggest a qualitative impact of the contamination of Toulon Bay on the ultraphytoplanktonic community, but no quantitative negative effect.

At a long-time scale, salinity was identified as a driver of the ultraphytoplankton community structure in several coastal lagoons (Bonato *et al.*, 2016). In Toulon Bay, a salinity gradient could only be observed after storm events, as recorded in our 2015 field campaign (three consecutive days of heavy rain,Figure A- 2). Moreover, the magnitude of this gradient was not significant and limited to the coastline exposed to small river runoffs. Such salinity gradients are specific for the Mediterranean climate and do not persist for more than a few days. They were not observed in 2014, when the ultraphytoplankton community structure gradient was even stronger than in 2015. Since the ultraphytoplanktonic community responds

to environmental changes at the day or week scale (Thyssen *et al.*, 2014), punctual and rare variations in salinity of surface waters do not appear as a potential driver of the spatial heterogeneity in ultraphytoplankton community structure observed in Toulon Bay.

Concentrations of major nutrients, such as nitrate and phosphate, can greatly affect ultraphytoplanktonic community abundance and structure (Schapira *et al.*, 2010; Bec *et al.*, 2011; Thyssen *et al.*, 2014; Bonato *et al.*, 2016). As shown in several studies in the northwestern Mediterranean Sea, which is one of the most oligotrophic seas in the world, PO_4^{3-} concentrations rarely exceeded 0.01 mg P L^{-1} (Van Wambeke *et al.*, 2002; Krom *et al.*, 2010). Therefore, PO_4^{3-} is likely to be more limiting than NO_3^- in the Mediterranean Sea. Consequently, the N: P ratio is characteristically high (around 20) compared to an average value of only 16 for the global ocean (Redfield, 1963) and can result in changes in the abundance, community structure, and size class of ultraphytoplankton (Heisler *et al.*, 2008; Garmendia *et al.*, 2011). In our study, globally similar PO_4^{3-} and NO_3^- gradients were observed in Toulon Bay, which resulted in a high N: P ratio of 20 throughout the entire bay, as previously observed (Boge *et al.*, 2006). Additionally, the patchy distribution of nitrate concentration in the LiB could be associated to significantly positive correlations with pico- and nanophytoplankton. These observations suggest that nutrients only slightly contribute to this biological gradient in the whole bay, which has been reinforced by RDA analysis. However, nutrients could also promote large localized ultraphytoplankton production.

Light intensity or penetration and biotic interactions (*i.e.* predation and competition) are other well-known factors which influence microbial community structures in coastal environments (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004; Clements and Rohr, 2009; Genitsaris *et al.*, 2015; Girault *et al.*, 2015; Häder and Gao, 2015; Bonato *et al.*, 2016), although they were not considered in our study. Intensified solar radiation might be the cause for the increased dominance of *Synechococcus* (Casotti *et al.*, 2003) or some pico- or nano-eukaryotes (Brunet *et al.*, 2006, 2007) in the Mediterranean Sea, partly contributing to the unexplained variance identified by RDA analysis. However, since this variance remained small, our study suggests that such parameters only slightly impact the spatial structure of the ultraphytoplanktonic community in Toulon Bay.

On the other hand, we observed significant correlations between dissolved trace metal concentrations (Cd, Cu, Pb, and Zn) and the distributions of *SYN* and *P-Eu* cells. Moreover, the contribution of dissolved Cu and Pb contamination in the spatial variations observed for

community structure, assessed by RDA analysis, appeared as the highest one among the variables taken into consideration. Considering the panel of potential toxic effects these pollutants have on phytoplankton (Payne and Price, 1999; Le Jeune *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2008; Jordi *et al.*, 2012; Lafabrie *et al.*, 2013; Castro-Bugallo *et al.*, 2014), observing such biological gradients in the water column of Toulon Bay appears rather logical. However, studies on such strong relationships between ultraphytoplankton and chemical pollutants are scarce.

Only a few studies have examined the relationships between trace metal contamination and ultraphytoplankton distribution or structure. In the context of the Mediterranean Sea, where anthropogenic contributions in metal inputs interact with the increasing demographic development, making the Mediterranean Sea even more sensitive (*e.g.* Elbaz-Poulichet *et al.*, 2011; The Mermex Group *et al.*, 2011), previous studies mainly focused on contamination impacts on higher trophic level organisms (*e.g.* Harmelin-Vivien *et al.*, 2009), whereas the responses of phytoplankton remain poorly documented. Le Jeune *et al.* (2006) have demonstrated that Cu acts as a restructuring agent in terms of size-class structure and taxonomic diversity of the phytoplanktonic community by indirect toxic effects modifying trophic interactions. In the same way, (Croot *et al.*, 2002) have concluded that trace metals might play an important role by inducing the selection of particular species. Despite their importance in biogeochemical cycles and trophic web dynamics in the global ocean (Uitz *et al.*, 2010), nearly nothing is known about general patterns of ultraphytoplankton temporal and spatial variability and the factors controlling the structure of ultraphytoplanktonic communities (Bonato *et al.*, 2016).

Differences among ultraphytoplanktonic species in sensitivity and resistance potential are two potential drivers of composition turnovers (Blanck *et al.*, 1988) and could explain the distribution gradients observed in Toulon Bay. Differences in sensitivity can be linked to cell size and the surface to volume ratio. According to theory (Raven, 1984; Reynolds, 1984; Finkel, 2001), the smallest cells, presenting the highest exchange surface, would be the most sensitive ones. This has been confirmed more recently for marine ultraphytoplankton in comparative studies (Miao *et al.*, 2005; Echeveste *et al.*, 2012). In particular, exposure to toxic trace metals could lead to the selection of both the largest species and the largest cells within a single population. Our study highlights the replacement of small species (*SYN* cells) by larger ones (*P-Eu* cells) in the most contaminated areas, with the abundance of the smallest species being

strongly negatively correlated to the concentration of dissolved trace metals. Despite the positive correlation between *PRO* and Pb in Toulon Bay, *PRO* was the least abundant group in both years, and its abundance did not differ significantly between the LaB and the LiB. Indeed, previous studies have shown that concentrations of *PRO* measured by flow cytometry in the Mediterranean Sea ranged from 4 to 7 × 10^4 cells mL^{-1} (Li *et al.*, 1993; Grégori *et al.*, 2001), while the maximum concentration in Toulon Bay was 1.3 × 10^3 cells mL^{-1}. Thus, although the distribution of *PRO* was not homogeneous in Toulon Bay during both field campaigns, its low abundance makes it difficult to draw conclusions about spatial distribution and statistical relations with abiotic parameters for this group, especially with flow cytometer analysis. Moreover, cyanobacteria were relatively sensitive to Cu toxicity, especially when compared to eukaryotic phytoplankton (Moffett *et al.*, 1997; Mann *et al.*, 2002; Twiss *et al.*, 2004; Le Jeune *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2015). Quigg *et al.* (2006) and Semeniuk *et al.* (2016) have suggested that the higher Cu uptake rate in cyanobacteria (several orders of magnitude higher than for other phytoplankton) might account for such high sensitivity to Cu toxicity. The ancestral heritage of cyanobacteria could also account for their higher sensitivity. Indeed, the cyanobacterial ancestors arose initially in an anoxic ocean where bioavailability of trace metal was low; thus, a low trace metal requirement was developed in cyanobacteria to adapt to a trace metal-deficient environment (Cavet *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003). Modern cyanobacteria may have retained the same trace metal requirement system inherited from their ancestors; thus, a high sensitivity to elevated concentrations of trace metals would occur (Saito *et al.*, 2003). All these bibliographic elements are in agreement with the apparent strong sensitivity of the *SYN* group to trace metals in Toulon Bay.

Interestingly, no major difference in ultraphytoplankton abundance was observed along the contamination gradient of Toulon Bay. This could be related to the ability of *P-Eu* cells to use defense mechanisms, such as the production of glutathione and phytochelatins (Ahner *et al.*, 1996, 2002; Kawakami *et al.*, 2006; Fairbrother *et al.*, 2007). Moreover, eukaryotic phytoplankton can intracellularly detoxify trace metals by sequestering them in an internal compartment (Soldo *et al.*, 2005). Fewer intracellular metal compartments were found in prokaryotic cyanobacteria, leading to lower levels of detoxification of surplus internal trace metals (Soldo *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2010). While the abilities of the largest cells (*i.e.* picoeukaryote-like cells) to produce more of these defense molecules as well as the metal contents of the cells need further investigation in Toulon Bay, these elements both emphasize

the higher resistance potential of picoeukaryotes to toxic trace metals, a reliable hypothesis that could explain their dominance in the contaminated waters of Toulon Bay. In addition, whether the *Synechococcus*-like population usually refers to this single genus, genetic diversity investigations have demonstrated that picoeukaryotic-like populations identified by flow cytometry often included representatives of various eukaryotic families (Shi *et al.*, 2011). Thus, the changes we observed in ultraphytoplankton structure, with the dominance of picoeukaryote-like cells in case of metal contamination, could be linked to a higher diversity in the eukaryote-like group and a consequent higher probability of presence of metal-resistant individuals.

Altogether, our field-related results tend to put forward the potential major influence of toxic trace metal contamination in driving the ultraphytoplanktonic community in Toulon Bay by representing a strong local selective pressure. Experiments under controlled conditions were conducted to test the specific effect of different types of contamination representative of coastal areas on ultraphytoplankton.

III.2.5.3. Disentangling the drivers structuring the ultraphytoplanktonic community in Toulon Bay

Three experiments under controlled conditions, consisting of the artificial exposure of microbial communities to Cu, Pb, and Zn, demonstrated the strong and rapid toxicity of the cocktail of trace metals, with the loss of 90 to 99% of total ultraphytoplanktonic abundance in only six days, although the concentrations added were lower than the highest concentrations observed in Toulon Bay for both mappings. Although the physiological effects of toxic metals are well characterized in the literature, such demonstration of toxicity for natural and complex communities with environmentally relevant concentrations of trace metals remains poorly documented.

After one week of exposure, total abundance of ultraphytoplankton increased gradually until the end of the experiment, when we observed a similar order of magnitude to that at the beginning of the experiment. Such rapid recolonization could be explained by the modification of the bioavailability of trace metals. Bioavailability of trace metals depends on their chemical speciation, which is strongly controlled by the presence of dissolved organic ligands, especially in marine waters (Bruland and Lohan, 2006). For instance, in the open sea,

with a dissolved Cu concentration of a few nM, the organic carbon fraction of Cu often exceeds 99%, leading to an extremely low free Cu concentration, the most bioavailable fraction (Bruland and Lohan, 2006). Reversely, in coastal environments submitted to anthropogenic inputs of such trace metals (Turner, 2010), their organic fractions decrease due to the progressive saturation of the strongest ligands, inducing an amplified increase of free Cu, potentially reaching toxic levels (Louis, Garnier, Lenoble, Mounier, *et al.*, 2009; Louis, Garnier, Lenoble, Omanovic, *et al.*, 2009). Numerous studies suggest that trace metals binding to organic ligands result in reduced metal bioavailability and hence decreased toxicity (Lorenzo *et al.*, 2002; Mucha *et al.*, 2003; Boyd *et al.*, 2005; Le Jeune *et al.*, 2006). Although we did not measure DOC along the course of our experiments, the high phytoplanktonic mortality we observed with the artificial exposure to trace metals could have resulted in a slight DOC release (as noticed for most of the experiments when comparing DOC levels between the beginning and the end of the incubations), which could in turn have affected trace metal speciation. Thus, the quantitative recovery of ultraphytoplankton could partly be due to a reduced toxicity of the cocktail of trace metals, mainly because of chemical speciation changes. Whether the quality of such released DOC might be variable and might thus influence dissolved speciation, we hypothesize that dissolved speciation modification only concerned a fraction of the trace metals added in our experiment because of the limited DOC increase over the incubation experiments time course. Thereafter, the recovery of ultraphytoplankton must also partly be the result of the selection of resistant organisms.

In addition to the quantitative recovery of the ultraphytoplanktonic community, we also observed a significant shift in community structure during the experiments in the case of trace metal addition, irrespective of nitrate addition and Cu: Pb rations. Strikingly, although the initial community originated from an uncontaminated area, the final ultraphytoplanktonic structure was similar to what was observed in the most polluted zones of LiB. The addition of nitrate to the microcosms did not compensate the toxic effect of the cocktail of trace metals; neither did it promote any decrease in *SYN* cells or any increase in *P-Eu* cells. These observations were reinforced in the nitrate addition condition, which demonstrated that nitrate addition as such had no consequence on total ultraphytoplankton abundance and structure compared to the uncontaminated water condition (Figure A- 6). Our observations clearly demonstrate that trace metal contamination of marine water, resulting either from

direct inputs or sediment resuspension (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015), potentially impacts the dynamics and the structure of ultraphytoplanktonic communities.

Our results confirm that trace metal contamination is the main driver of ultraphytoplanktonic structure and superimposes the influence of nitrate enrichment in Toulon Bay. These results support the statistical relationships obtained from our field sampling. They also complement the few studies that support the toxic and structuring effects of trace metals on phytoplankton (Le Jeune *et al.*, 2006; Lafabrie *et al.*, 2013) by highlighting the strong impact of human activities on the ultraphytoplanktonic community in marine coastal areas.

III.2.5.4. Assessing the consequences of mixing chemically contrasted natural waters for the ultraphytoplankton community

We also performed experiments consisting in mixing natural microbial communities from an uncontaminated site with naturally contaminated water (< 0.2 µm). When this water originated from the most polluted area of the bay, the total abundance and the structure of ultraphytoplankton were not affected, suggesting that the overall toxicity of trace metals after natural water mixing is less important than artificial contamination. On the one hand, it should be noted that the trace metal concentrations measured in the sample from the contaminated site (MIS) were lower than previously observed at this site during the Toulon Bay surface water mapping. This resulted in a small contamination when compared to the levels encountered in the uncontaminated site (41p) (Tableau III-1), far lower than the contamination simulated by artificial trace metal addition. Consequently, the absence of toxicity observed in the mixing of these two waters (water incubation, condition D) could potentially be related to trace metal concentrations not high enough to exceed the toxicity threshold of the considered organisms. On the other hand, MIS water and MIS sediments were characterized by a significant number of inorganic (*i.e.* Ag, Bi, Hg, Sb, and Sn), organometallic (*i.e.* TBT), and organic (*i.e.* PAH and PCB) substances (Misson *et al.*, 2016; Wafo *et al.*, 2016). This complex chemical cocktail could counterbalance the toxic effect of trace metals used in incubation experiments on ultraphytoplankton communities. The complexity of various chemical interactions, such as the antagonistic effects of pollutants, has previously been demonstrated (Sunda and Huntsman, 1995; Vasconcelos and Leal, 2001; Fairbrother *et al.*, 2007; Mayer-Pinto *et al.*, 2010). However,

we suggest an in-depth geochemical characterization of the environment and further ecotoxicological studies to provide a holistic and detailed comprehension of such natural phenomena.

In another series of experiments, water contamination originated from resuspension. While this elutriate slightly stimulated the growth of the ultraphytoplanktonic community, it also deeply affected its structure, resulting in a final structure similar to what was observed by artificially adding trace metals and dominated by *P-Eu* cells. This elutriate appeared enriched in both nutrients and trace metals when compared to the water of the uncontaminated site. Thus, the stimulation of total ultraphytoplanktonic abundance in elutriate incubation suggests that nutrient enrichment supported the growth of the community and partly compensated the toxic effects of trace metals on ultraphytoplankton abundance, as reported previously (Schallenberg and Burns, 2004), while being inefficient in preventing composition turnover. However, further studies are needed to assess reciprocal impacts between toxic effects of contaminants and ultraphytoplanktonic communities.

III.2.6. Conclusion

In this study, the relation between spatial variations of both abundance and structure of ultraphytoplankton and toxic trace metals in an anthropized Mediterranean coastal area was examined. We have demonstrated the strong influence of the water chemical signature on the marine coastal ultraphytoplanktonic community structure. Our study confirms the role of trace metals as a major driving factor representing a selective pressure on the ultraphytoplanktonic community in Toulon Bay, already observed in other Mediterranean ecosystems. Differences among ultraphytoplanktonic species in sensitivity and resistance potential are two potential drivers of composition turnovers and could explain the strong links between trace metal gradients and ultraphytoplanktonic gradients observed in field surveys. These observations were validated by experiments under controlled conditions. Artificial exposure of the ultraphytoplanktonic community from uncontaminated sites to environmentally relevant Cu, Pb, and Zn contaminations demonstrated the strong and rapid toxicity of this cocktail, with the loss of 90 to 99% of total abundance within only six days. Despite this toxicity, we also observed a rapid quantitative recovery, which might be the result of (i) the modification of the bioavailability of trace metals and (ii) the selection of resistant

organisms. However, further studies are required to assess reciprocal impacts between microbial communities and contaminants. Analysis of ultraphytoplanktonic community diversity by next-generation sequencing will help to understand whether the apparent tolerance to metals of some populations is driven by specific ultraphytoplanktonic species or mechanisms.

Acknowledgement

This study was supported by MerMex-WP3-C3A research program (part of the international IMBER project), METOPHYTO program (funded by the FR ECCOREV) and PREVENT research program (funded by “Toulon University”, “Toulon-Provence-Méditerranée (TPM)” and the “Conseil Départemental du Var”). C. Coclet PhD was funded by the "Région PACA" and supported by TPM. The authors wish to thank the French Navy and the LASEM for diving and sampling assistance, Dr. J.-F. Briand (MAPIEM, Toulon, France), Dr. G. Culioli (MAPIEM, Toulon, France), Dr. D.-H. Dang (Water Quality Center, Trent University, Canada) and L. Favre (MAPIEM, Toulon, France) for sampling and sample treatment assistance.

III.3. Impact of sediment dredging on seawater quality: a long-term monitoring study of trace metals and microbial community in Toulon Bay (France)

La deuxième partie de ce chapitre est présentée sous la forme d'un article soumis dans la revue *Science of the Total Environment.* Cette étude s'inscrit dans un suivi à long-terme des communautés ultraplanctoniques dans la rade de Toulon, auquel j'ai participé durant ma thèse. Cette campagne a permis de mettre en évidence des variations spatiales mais aussi des variations temporelles des communautés ultraplanctoniques. Enfin, la prise en compte d'une période de dragage durant ce suivi a permis de mieux comprendre les processus régissant les communautés ultraplanctoniques lors d'une remise en suspension de sédiments contaminés. Les références sont toutes présentes dans la partie Références à la fin de ce manuscrit.

Nicolas Layglon[1,*], Benjamin Misson[1], Gaël Durieu[1], Clément Coclet[1,2] , Sébastien D'Onofrio[1], David François[3], Jean-Ulrich Mullot[3], Stéphane Mounier[1], Véronique Lenoble[1], Dario Omanović[4], Cédric Garnier[1]

[1]*Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, Marseille, France*

[2]*MAPIEM, EA4323, Université de Toulon, Toulon, France*

[3]*LASEM-Toulon, Base Navale De Toulon, BP 61, 83800 Toulon, France*

[4]*Center for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, P.O. Box 180, 10002 Zagreb, Croatia*

[*] *Corresponding author: nicolas.layglon@univ-tln.fr*

III.3.1. Abstract

Dredging is a common and necessary operation in silted harbors. Yet the sediment is strongly altered during such operation, leading to potential dispersion of various contaminants in the surrounding ecosystem. A long-term monitoring was performed for 46 months spreading before, during and after a dredging operation in Toulon Bay. During this study, total and dissolved Cu and Pb concentrations, DGT-labile Pb fraction as well as the abundance and structure of the ultraplanktonic community were monitored. Four sites were surveyed: the dredging site, inside the dumping site, outside the dumping site and a remote site. This survey showed that during dredging period, the average concentrations of dissolved, total and DGT-labile Pb were statistically significantly higher compared to non-dredging period. This indicates that sediment resuspension could be the major source of Pb contamination. Although statistically not significant, an evident increase in both dissolved and total average Cu concentration at all sites during dredging period was recorded. This suggests that sediment resuspension is not the main source of Cu contamination which then occurred due to other processes or activities. Concerning the microbial community, neither the abundance nor the structure of ultraphytoplankton was affected during the dredging period. However, the abundance of heterotrophic prokaryotes significantly increased. This long-term monitoring also demonstrated that the dredging activity resulted in a limited accentuation of the chemical and biological gradients already observed in Toulon Bay, shading the light on sediment resuspension as a major driver of Pb contamination as well as of the heterotrophic prokaryotes distribution in this anthropized bay.

Keywords: Trace metals, Microbial communities, dredged sediment, monitoring

III.3.2. Introduction

Coastal areas are of great interest for the human population, which benefits from both continental and marine resources and develops a large panel of industrial, commercial and recreational activities, yet representing a diverse panel of contaminant sources (Micheli *et al.*, 2013). Coastal environments, as the continent-ocean interface, therefore allow the diffusion of many anthropogenic contaminants into the marine environment which collects both continental emissions and direct coastal ones. Trace metal (TM), some of the most threatening contaminants, are emitted from point sources, namely industrial and urban effluents, or rather diffuse sources such as runoff water or atmospheric deposition (Goldberg, 1995; McIntyre, 1995; Bhurtun *et al.*, 2019). As a final consequence, TM inputs in coastal ecosystems related to anthropogenic activities can multiply by 100 the initial TM concentration (Morley *et al.*, 1997; Tessier *et al.*, 2011; D. Cossa *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Twining *et al.*, 2015). In a considered ecosystem, TM can be found under different forms: particulate, dissolved and colloidal (Kennish, 2002; Nicolau *et al.*, 2012), which will finally determine their reactivity, toxicity and also bioavailability (Dassenakis *et al.*, 1997; Paquin *et al.*, 2002; Chiasson-gould *et al.*, 2014; Pothier *et al.*, 2018).

Much of the initially dissolved TM can bind to a solid phase (sediments, colloids) according to four main mechanisms: adsorption and ion exchange, precipitation or co-precipitation at the solid surface and absorption (Flores-rodriguez, 1992). Particles will eventually settle down to sediments, which turn into an important sink for trace metals (Cappuyns and Swennen, 2005; Di Nanno *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2013).

With global change, Man was pushed to build more efficient and, at the same time, more impressive boats. Due to siltation phenomena, harbors become less accessible and therefore need to be dredged to allow ships to moor. During dredging activities, sediment can become a major source of pollution (Torres *et al.*, 2009). Indeed, sediment resuspension leads to an important release of metals in the water column both in the particulate and dissolved phases (Cappuyns and Swennen, 2005; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Monnin *et al.*, 2018; Vidal-Durà *et al.*, 2018). Regarding the latter, a much bigger discharge of metals occurs as a flush when the sediment is resuspended compared to the continuous flux due to their diffusion from the sediments porewater to the water column (Louriño-Cabana *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013; Superville *et al.*, 2014). Metals issuing from resuspension were proven as potentially

bioavailable (Vink, 2009; Superville *et al.*, 2014) leading to a noxious impact onto the biota (Rochelle-Newall *et al.*, 2008).

Due to historical (WWII) as well as current activities, Toulon bay is subjected to strong anthropogenic pressure resulting in a significant multi-contamination in metals (Tessier *et al.*, 2011), metalloids (D. Cossa *et al.*, 2014; Dang, Lenoble, *et al.*, 2014; Dang, Tessier, *et al.*, 2014), organometals (Pougnet *et al.*, 2014) and organic contaminants (Misson *et al.*, 2016; Wafo *et al.*, 2016). This heavy multi-contamination, coupled to natural gradients of relatively low amplitude (Coclet *et al.*, 2018) and quite long water residence time (Dufresne *et al.*, 2014), turns this site a model ecosystem to study contaminant transfers between the water column and sediments.

Dredging impact on the biota is often only characterized on model organisms and/or macroorganisms (Bocchetti *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2009; Wan Hussin *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2017; Wenger *et al.*, 2018). Its influence on the ecologically-meaningful microbial realm remains therefore to be documented. In the marine coastal environment, our understanding of microbial ecology is often challenged by our inability to disentangle multiple natural and anthropogenic gradients. To date, most observations are related to the impact of dredging activities on heterotrophic microbial communities in the water column, in the sediment or in holobionts, both at dredging and dumping sites (Störmer *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016; Pineda *et al.*, 2017; Won *et al.*, 2017). However, the impact of dredging activities on marine phytoplankton, and especially on ultraphytoplankton (< 20 µm) needs to be determined, as they represent a key microbial group contributing to approximately 45–70% of the primary production in open-ocean ecosystems and to more than 50% near Northern Mediterranean coasts (Magazzù and Decembrini, 1989; Field *et al.*, 1998; Garcia-Pichel *et al.*, 2003; Scanlan, 2003; Uitz *et al.*, 2010).

A combination of discrete water sampling and continuous passive sampling was used during 46 months to evaluate TM partitioning between the dissolved phase and the particles, their lability and the potential links with ultraplankton (*i.e.* heterotrophic prokaryotes and ultraphytoplanktonic) distribution and community structure.

III.3.3. Experimental

III.3.3.1. Study site

Toulon Bay, located in North-Western Mediterranean Sea and South-East of France, is basically divided into two parts named small Bay (9.8 km²) and large Bay (42.2 km²) (Figure III-9). The small bay is a semi-enclosed shallow bay (12 m average depth) with an estimated water residence time of 1.5 to 7.5 days (Dufresne *et al.*, 2014). Also, it has the particularity to host the Naval base of Toulon which is the first French harbor. As a consequence of the highly-contaminated water column and sediments, there is a concentration gradient of inorganic and organic compounds from the small to the large bay (Tessier *et al.*, 2011; Pougnet *et al.*, 2014; Dang, Lenoble, *et al.*, 2015; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Coclet *et al.*, 2018). The large bay is connected to the open sea, with a bathymetry characterized by increasing depth towards the open sea (the maximum depth is about 50 m). Although not isolated from each other, the two bays are separated by a dike built in 1882 (length: 1.4 km). The bays are connected by a 0.5 km wide channel (average depth is 30 m), which serves as the main hydrological transfer zone. The four main locations of confirmed or potential anthropogenic influence within the bay are (1) Navy and civil harbors, (2) sewage outlets, (3) aquaculture fields, and (4) the two urban river outlets (Las and Eygoutier).

For the purpose of this work, four sites were chosen for the monthly monitoring, as presented in Figure III-9. These sites were selected in order to follow metals' concentration as well as the abundance and structure of ultraplanktonic community at (1) the dredging site (DS), (2) inside the dumping site (IDuS), (3) outside the dumping site (ODuS) (a few meters away from IDuS) and (4) a remote site (RS) (near fish farming area) to evaluate the environmental impact due to the dredging activity.

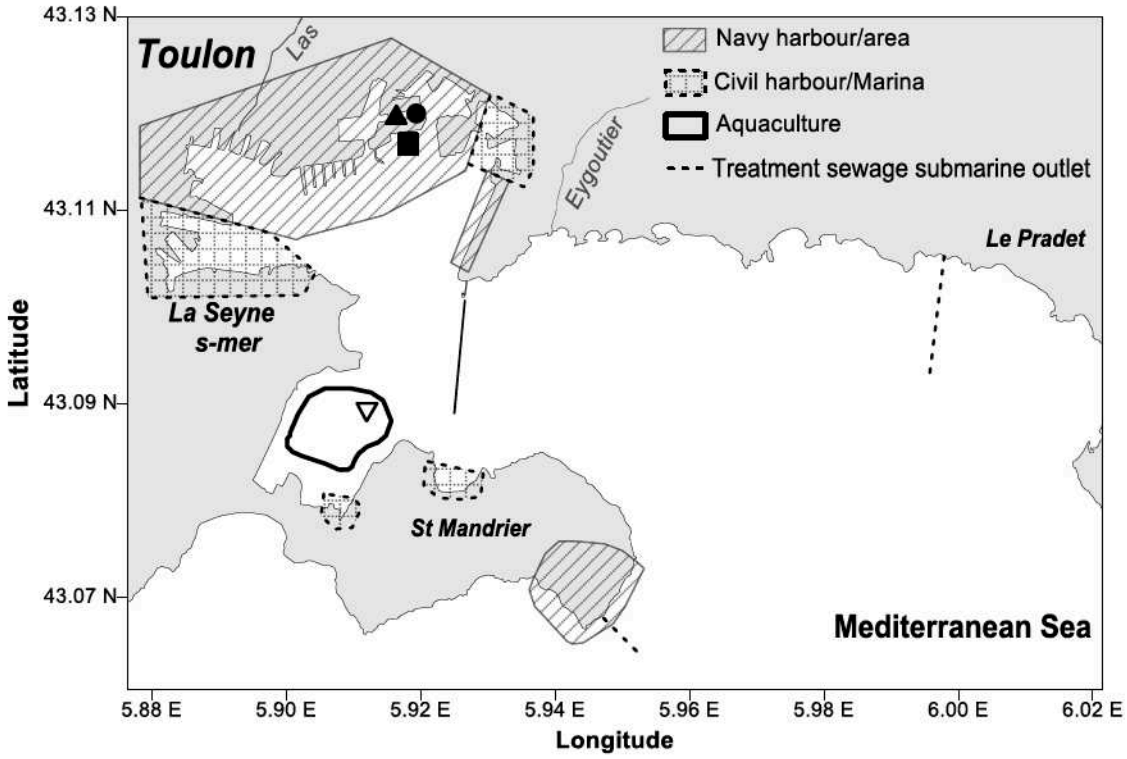


Figure III-9 Location of the monitoring sites and the main anthropogenic activities in Toulon Bay. Closed square: dredging site (DS), closed triangle: inside the dumping site (IDuS) (inside the geotextile bag), closed circle: outside the dumping site (ODuS) (outside the geotextile bag), open triangle: remote site (RS) (near the fish farming area).

III.3.3.2. Sampling and samples pretreatment

Surface seawater was monthly sampled from October 2012 to December 2017: before the dredging, during the dredging (carried out between September 2014 and January 2016) and after the dredging. Note that for dumping site, the geotextile bag was only present during the dredging operation (from September 2014 to January 2016), thus IDuS could not be sampled apart from the dredging period, whereas DS and RS were sampled along the survey and ODuS was sampled from July 2014 to December 2017. Samples were collected at 5m depth using a horizontal water sampler (Wildco 4.2L), previously acid-cleaned (10% v/v HNO_3, pro analysis, Fisher Scientific) and fully rinsed with Milli-Q water (18.2MΩ, Millipore) in the laboratory before being rinsed on field with acidified Milli-Q water (0.1% v/v HCl, TraceSelect, Fluka) and then conditioned with water from the site.

One litre of seawater was stored in fluorinated ethylene propylene (FEP) bottles (Naglene), which had previously been carefully cleaned (10% HNO_3 (Fisher Scientific Pro), rinsed three times with MQ (18.2MΩ, Millipore) and filled with 0.1% v/v HCl (TraceSelect, Fluka) and rinsed three times with raw water from the site. Back to the lab, these 1L samples were immediately filtered and/or conditioned under a trace-metal-clean laminar hood. For analysis of dissolved (filtered sample using 0.2 µm cellulose acetate syringe filter (Sartorius) pre-rinsed and conditioned following the same protocol as described for 1L FEP bottles) and total acid leachable trace metal concentrations (unfiltered samples), 125mL of each fraction was stored into trace metal clean FEP bottles. Samples were acidified with 0.2% v/v with HNO_3 s.p (Merck) before being UV-irradiated (150-W mercury lamp, Hanau, Germany) for at least 24h in order to completely decompose organic matter and assess the concentrations of trace metal elements by stripping voltammetry.

From January 2015 to December 2017, subsamples of 10 mL of seawater were filtered on field through a 25 mm swinnex (Millipore, USA) equipped with a 90 µm nylon mesh and fixed with 0.25% glutaraldehyde (final concentration). Back to the lab, samples were frozen at -80°C until flow cytometry analyses.

In addition to discrete water sampling for analysis of dissolved and total metal concentrations, DGT passive samplers were deployed at three sites (DS, ODuS, RS) in order to constantly monitor time-weighted average concentration of Pb. Open pore Chelex-DGT probes (DGT Research, UK) were deployed on a weekly basis. After deployment time, DGT probes were removed from the holder, externally rinsed with Milli-Q water on field to remove the excess of salt water, stored in plastic bags and thereafter processed in the laboratory. A trace metal-clean technique under laminar hood was used to remove chelex resin gel with accumulated Pb, which was finally eluted in 1 M HNO_3 s.p. (Carlo Erba Normatom II quality) solution during 24h.

III.3.3.3. Chemical analyses

The dissolved concentrations of trace metals (Cu and Pb) were determined by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV). The measurements were carried out using an AutolabIII potentiostat (EcoChemie) equipped with the autosampler. A three-electrode system (663 VA Stand, Metrohm) consisting of Hg working electrode (size 2), Ag/AgCl/3M KCl

reference electrode and Pt counter electrode was used for measurements. Automated measurements were controlled by the GPES 4.9 software (EcoChemie). Quantification of the trace metal concentrations was performed by using a method of standard additions. Additions were automated using syringe burettes (Pump XE 1000, TECAN). Voltammograms were processed (peak height of 2nd derivative as analytical signal characteristic) using ECDSOFT software (Omanović and Branica, 1998). Additional information can be found elsewhere (Louis, Garnier, Lenoble, Mounier, *et al.*, 2009; Oursel *et al.*, 2013; Cindrić *et al.*, 2015).

Determination of DGT-labile Pb concentration in DGT eluates was performed in undiluted samples using an Atomic Absorption Spectrometer (Varian, AA 240Z) coupled with a graphite furnace (Varian, GTA120). Calculation of DGT-labile Pb concentrations was performed using diffusion coefficients (corrected for average temperature during deployment period) supplied by DGT-Research company.

III.3.3.4. Microbial community characterization

Autotrophic prokaryotes (*Synechococcus*-like) and photosynthetic picoeukaryotes were characterized and enumerated using a BD Accury™ C6 (BD Biosciences) flow cytometer, as previously described (Coclet *et al.*, 2018). The differentiation between pico- and nanoplanktonic cells was performed with the help of non-fluorescent size calibration beads (ThermoFisher). Two nanoeukaryotic groups were differentiated: highly red fluorescent photosynthetic nanoeukaryotes (HR PNE) and highly orange fluorescent photosynthetic nanoeukaryotes (HO PNE). Free-living heterotrophic prokaryotes (HP) were enumerated after staining with SYBR Green as previously described (Cabrol *et al.*, 2017).

III.3.1.5. Statistical analyses

The single and crossed influences of sampling site and sampling period (*i.e.* during or apart from the dredging period) on microbial abundances of TM contamination of the water were assessed through two-ways ANOVA and Tukey post-hoc comparisons. These analyses were performed by using RStudio (RStudio team, packages *stats* and *agricolae*).

In order to correlate dissolved and total concentrations of trace metals, a homemade software named Corrdata (developed by Dr. Omanović) based on a Spearman's correlation was used.

III.3.4. Results and discussion

III.3.4.1. Trace metal levels in the bay apart from the dredging activities period

A north-south decreasing gradient of both total and dissolved metal concentrations was observed in the bay for the non-dredging period (Figure III-10). The concentration levels of both Cu and Pb were the highest in the Northern part of the bay, with an enrichment factor around 4-5 for both Cu and Pb in ODuS when compared to RS, and also in RS when compared to open Mediterranean seawater. DS presented intermediate but still high concentrations (Tableau III-2). This spatial gradient clearly reflects the anthropization of the northern part of the bay in which various industrial and harbor sources contributing to the contamination are located (Tessier *et al.*, 2011; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Coclet *et al.*, 2018).

Tableau III-2 Ranges and average values of dissolved and total Cu and Pb concentrations (in nM) at the three sites monitored apart from the dredging period.

Element	Site	Min	Average	Max	EF
Cu_D	RS	3.40	10.14	20.76	5.07
	DrS	5.50	17.08	46.10	8.54
	ODuS	12.93	37.14	73.16	18.57
Cu_T	RS	4.52	11.57	22.16	
	DrS	9.86	23.03	37.83	
	ODuS	18.11	52.85	95.14	
Pb_D	RS	0.13	0.50	1.05	5.01
	DrS	0.36	1.00	1.78	9.99
	ODuS	1.65	2.36	3.90	23.64
Pb_T	RS	0.30	0.82	1.42	
	DrS	0.54	1.82	3.70	
	ODuS	2.15	4.27	9.74	

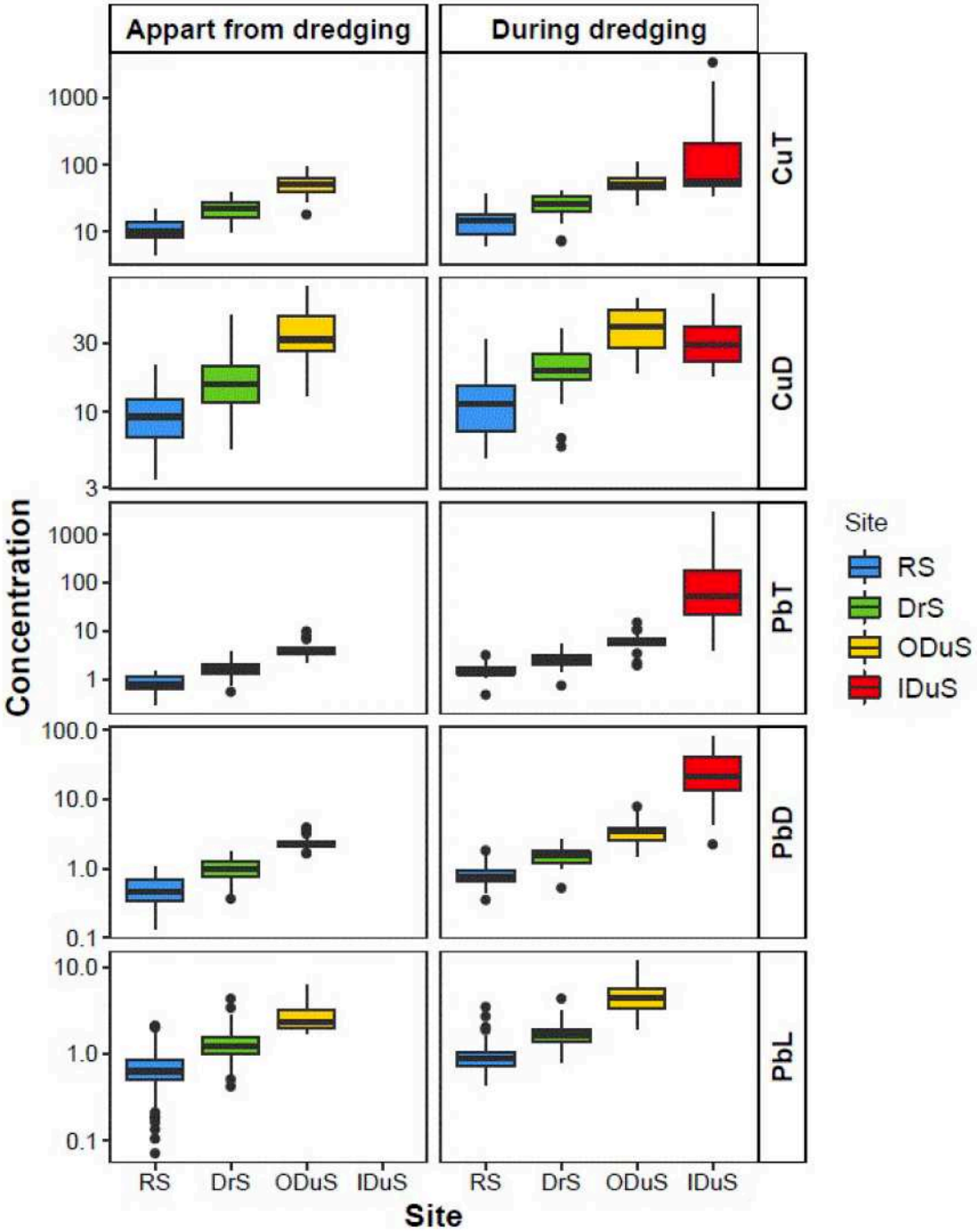


Figure III-10 Spatial variations of Cu and Pb concentrations during the two define periods (apart from dredging and during dredging). No data were collected for Pb DGT-labile fraction at IDuS because no DGT could be deployed at this site. Note that concentration scale is given in log-units.

The difference between DS and ODuS could be linked to their respective hydrodynamics, DS being located in a rather open part whereas ODuS was located at the bottom of a very enclosed dead-end, thus experiencing limited water exchanges. Similar concentration gradients were observed in other studies of semi-enclosed bays and were explained by combinations of point contaminant sources, the hydrodynamics of the zone, diffusive fluxes from sediment, as well as sediment resuspension events (Sanudo-Wilhelmy and Flegal, 1996; Lares *et al.*, 2009; Cindrić *et al.*, 2015). Such spatial contamination gradient had already been previously observed by punctual mappings of Toulon Bay (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Coclet *et al.*, 2018) or during a one-month survey (Coclet *et al.*, 2019). Our study clearly demonstrates that this spatial contamination gradient remains stable at a pluri-annual time scale (Figure B- 1).

Moreover, this long-term observation clearly highlighted the synchronized, pluri-annual pattern of this contamination gradient: the increase in concentration observed at the most contaminated site at one defined period was mostly reflected at the other sites but to a lower extent (Figure B- 1). Such synchronized behavior clearly indicates contaminant transfer by the water column in both the dissolved and particulate phases from northern sources to southern locations. It may be explained by the hydrodynamics of the bay characterized by large water exchange between the cleaner large bay and the anthropized small bay through the largest channel located in the southern part of the small bay (Dufresne *et al.*, 2014).

In the studied area, the proportion of dissolved Pb in the water column was steady (57 ± 3% on average), demonstrating the absence of any spatial trend in the partitioning of Pb between the dissolved and particulate phases. On the contrary, the proportion of dissolved Cu exhibited variations among sites: lower in the northern part (74% at DS and 70% at ODuS) compared to RS (88%). Dissolved fractions for both metals were within the range found for anthropized costal zones (Oursel *et al.*, 2013, 2014; Cindrić *et al.*, 2015). Furthermore, Cu_T/Pb_T ratio was globally homogeneous (~18 ± 2) as well as Cu_D/Pb_D (13 ± 1).

This spatially-homogeneous ratio tends to point out sediment as a common source of contamination for both metals at every site, resulting in a different contamination level of the water due to different sediment contamination levels (Tessier *et al.*, 2011) and probable dilution effect according to hydrodynamics.

DGT-labile concentration is considered as the potentially bioavailable fraction. This relation is supported by few studies which found that the accumulated metal in biota are

better correlated with DGT-labile fraction than with dissolved fraction (Caillat *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016). As observed for total and dissolved Pb concentrations, DGT-labile Pb concentrations showed a decreasing trend from ODuS towards RS (Figure III-9.), with evident synchronized temporal trends at every site (Figure B- 1).

The main benefit of using DGT passive samplers is to provide continuous and time integrated level of metal concentrations during deployment period. No correlation was found between DGT-labile Pb and dissolved Pb, which could be explained by the different sampling methodology (*i.e.* discrete vs. passive and integrated). Indeed, the concentration of DGT-labile Pb for some periods was higher than the corresponding dissolved Pb concentration. Such discrepancy was already observed for other dynamic systems (Cindrić *et al.*, 2017). It suggests a strong short-term variability of Pb concentration within the bay, which is also obvious on temporal profiles of DGT-labile Pb concentrations (Figure B- 1). Moreover, monthly discrete sampling was too occasional compared to one-week-long DGT deployments and not adequate to represent the DGT-deployment period.

III.3.4.2. Distribution and structure of ultraplancton apart from the dredging period

The abundance of HP ranged between 0.9 x 10^5 and 2.1 x 10^6 cells.mL^{-1}. These abundances are in the classical range of what is generally observed for coastal Mediterranean sites (Grégori *et al.*, 2001; Šantic *et al.*, 2012; Suffridge *et al.*, 2018) and of previous observations in Toulon Bay (Coclet *et al.*, 2018). Neither a clear temporal trend nor a temporally stable difference between sites as demonstrated for trace metal contamination could be observed (data not shown). Indeed, although HP abundance was sometimes enriched in the Northern enclosed area when compared to the southern site as previously observed during a short-term survey (Coclet *et al.*, 2018), similar HP abundances were also regularly observed at all sites during our longer-term monitoring. As a consequence, the average HP abundance was not statistically different between sites (one-way ANOVA, $p > 0.05$) (Figure III-11). Since this situation is quite different from the trace metal contamination gradient, which was observed at almost all the sampling dates, the trace metal contamination gradient can clearly not be the main driver of HP abundance dynamics in Toulon Bay. Longer-term temporal processes, such as annual water-temperature cycle (Fuhrman *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2009, 2012), resource availability (Fortunato *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2013) or the

structure of both phytoplanktonic and zooplanktonic communities (Gilbert *et al.*, 2012; Fuhrman *et al.*, 2015; Goni-Urriza *et al.*, 2018), all of them influencing the metabolic activity and the growth rate of HP, require further concern to better understand the long-term spatio-temporal dynamics of the HP community in Toulon Bay.

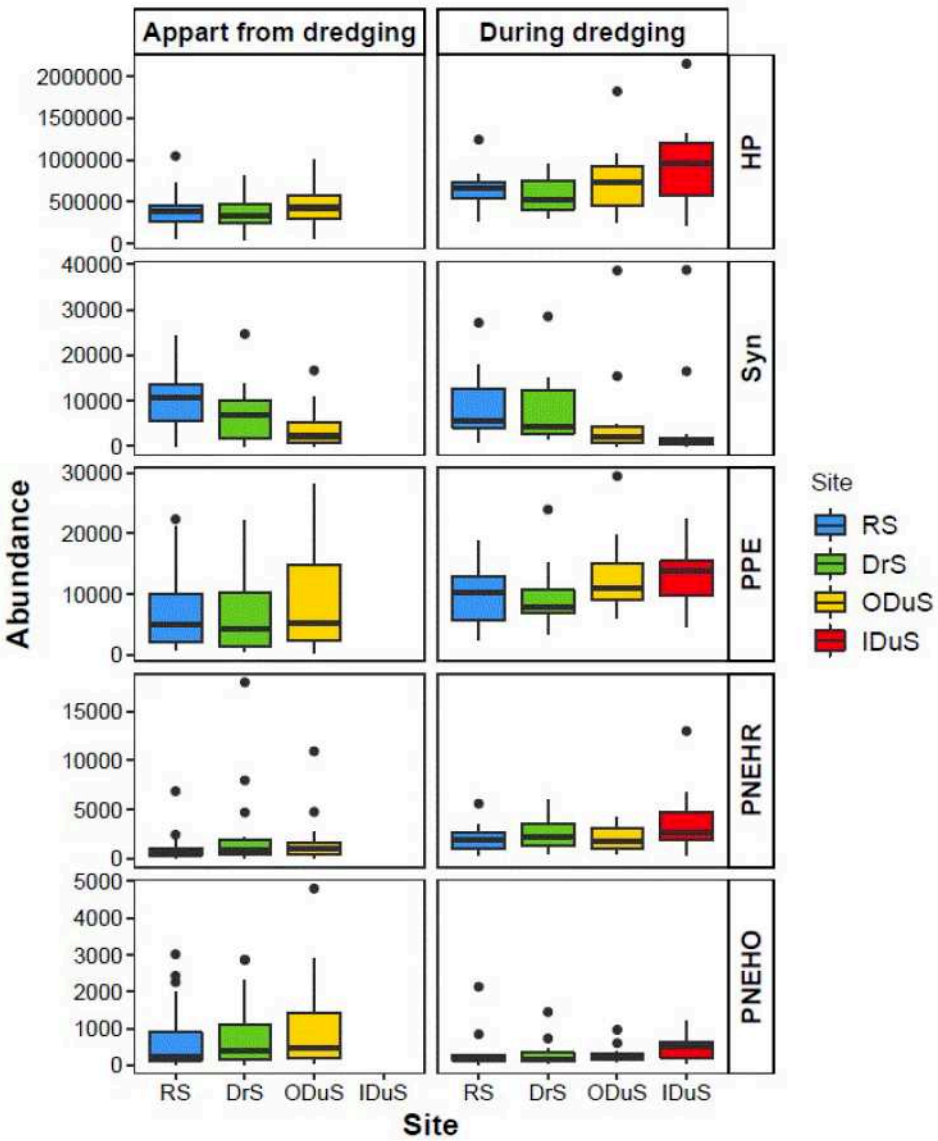


Figure III-11 Spatial variations of microbial groups' abundance during the two define periods (apart from dredging and during dredging). SYN: Synechococcus-like cells, PPE: Photosynthetic picoeukaryotes-like cells.

Similarly, ultraphytoplanktonic community's abundance range (4.5 x 10^3 to 6.8 x 10^4 cell.mL^{-1}) was in the range of other observations reported for Mediterranean coastal sites (Grégori *et al.*, 2001; Thyssen *et al.*, 2008, 2014) or previously in Toulon Bay (Coclet *et al.*, 2018; Delpy *et al.*, 2018) and did not show any clear temporal or spatial trend (data not shown). When considering the different phytoplanktonic subgroups, SYN and PPE where the most abundant, representing at least 70% of the community in 90% of the samples. SYN demonstrated a decreasing but non-significant trend towards the northern enclosed ODuS (Figure III-11) whereas PPE abundance appeared stable across sites (Figure III-11). As a consequence, a notable community structure shift was observed from a SYN-dominated (49.1% on average) ultraphytoplanktonic community in RS to a PPE-dominated (56.3% on average) community in ODuS. The proportion of these two most abundant ultraphytoplanktonic groups was highly variable through time, but the proportions of SYN and PPE were respectively higher and lower in RS site than in ODuS for more than 85% of the sampling dates. Concerning nanophytoplanktonic groups, HR PNE represented on average 10% of the community's abundance and appeared to be slightly more abundant in ODuS than in RS. Finally, HO PNE was the least abundant group (6% on average) and displayed no spatial trend. The spatial turnover mainly driven by picophytoplanktonic groups is in agreement with previous observations in Toulon Bay at either high spatial but low temporal frequency (Coclet *et al.*, 2018) or lower spatial but higher temporal frequency (Delpy *et al.*, 2018). The long-term stability of the spatial structure gradient echoes the long-term trace metal contamination gradient. Moreover, through an experimental approach, Coclet *et al.* (2018) demonstrated that trace metals could strongly affect the structure of ultraphytoplankton community, resulting in a structure shift corresponding well to the South to North structure gradient observed in this study. The higher sensitivity of the smallest cells to toxic compounds (Miao *et al.*, 2005; Echeveste *et al.*, 2012) could explain the lower proportions of SYN in the most contaminated sites. PPE cells being larger and their abundance appearing globally stable along the contamination gradient, one could think that this group is more resistant to and selected by these concentrations of trace metals because of a higher surface/volume ratio (Miao *et al.*, 2005; Echeveste *et al.*, 2012). However, Coclet *et al.* (2018) demonstrated that a cocktail of trace metals applied at concentrations inferior to the maxima observed during our long-term survey was also highly toxic for PPE. Thus, the trace metal contamination gradient of the bay cannot be considered as the sole important driver of ultraphytoplankton dynamics.

III.3.4.3. Trace metals spatial modification during dredging

A spatial gradient of contamination during dredging events was similar as the one apart from the dredging period (Figure III-10). However, higher temporal fluctuations and, in average, higher concentrations of both trace metals were registered during dredging period at all sites. The increase in average concentration was between 2.2 nM (dissolved) and 5.6 nM (total) for Cu, and 0.34 nM (dissolved) and 2.3 nM (total) for Pb. As the RS site is characterized by lowest concentrations, the rise in TM concentrations in fact produced the highest relative TM increase at this site (Tableau III-3). Statistical analysis confirmed that the increase of both dissolved and total Pb concentrations was significant (one-way ANOVA, $p < 0.05$). However, despite the evident increase of dissolved and total Cu concentrations at all sites (Tableau III-3), statistical analysis showed that the increase was this time not statistically significant.

Tableau III-3 The ranges and average values of dissolved and total Cu and Pb concentrations (in nM) at the four sites monitored during the dredging period. Values in parentheses corresponds to percentage and absolute (in nM) increase in concentrations compared to non-dredging period.

Element	Site	Min	Average	Max	EF
Cu_D	RS	4.78	12.52 (23%; 2.38)	31.98	6.26
	DS	5.75	20.72 (21%; 3.64)	37.52	10.36
	ODuS	18.63	40.35 (31%; 3.61)	60.70	20.17
	IDuS	17.63	31.84	65.60	15.92
Cu_T	RS	6.24	15.18 (31%; 3.61)	36.24	
	DS	7.19	25.23 (10%; 5.58)	41.54	
	ODuS	25.54	58.43 (68%; 0.34)	109.85	
	IDuS	34.01	440.00	3362.34	
Pb_D	RS	0.35	0.84 (69%; 0.34)	1.81	8.43
	DS	0.52	1.58 (58%; 0.58)	2.60	15.78
	ODuS	1.49	3.59 (51%; 1.22)	7.79	35.86
	IDuS	2.22	29.32	81.31	293.18
Pb_T	RS	0.47	1.51 (85%; 0.70)	3.12	
	DS	0.73	2.59 (43%; 0.77)	5.38	
	ODuS	1.91	6.56 (53%; 0.77)	14.86	
	IDuS	3.99	362.39	2978.76	

Total concentrations of Cu and Pb were very variable during the investigated period. It could increase up to 90 times for Cu and to 990 times for Pb between RS and IDuS (Figure III-10). Although suspended matter was not evaluated, such increase was likely to be due to the increase of suspended sediment particles since the difference between IDuS and ODuS reached 30 and 200 for Cu and Pb, respectively, although the two sites were only separated by a few meters and an anti-dispersion geotextile bag. The dissolved fractions of both Cu and Pb during dredging activities were globally homogeneous and similar to that determined apart from the dredging period in RS, DS and ODuS (70-80% for Cu, 55-60% for Pb). Inside the dumping site, the percentage of dissolved Cu and Pb was around 7%. This can be explained by an important concentration of particles inside the dumping site contaminated in both Cu and Pb (Tessier *et al.*, 2011). Furthermore, for some sampling dates inside the dumping site, both fractions of Pb highly increased whereas only the total fraction Cu increased. This could be due to the different remobilization kinetics of these two contaminants. Namely, it was shown that Cu is first adsorbed onto the particles (during the first hours) before being remobilized in the dissolved phase over prolonged period (after few days), whereas Pb is first desorbed from the particles (during the first hours) and then it is re-adsorbed onto those particles (after few days) (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Monnin *et al.*, 2018).

Using a Spearman correlation method, dissolved Cu was quite well correlated with total Cu at RS (0.961), DS (0.941) and ODuS (0.732) whereas at IDuS such data were not correlated. This might correspond to very important quantities of suspended matter at IDuS, thus offering more active sites for Cu surface complexation/adsorption and lowering the probability to increase dissolved Cu.

Furthermore, taking in account only RS, DS and ODuS Cu/total Pb (~10 ± 1) as well as dissolved Cu/dissolved Pb (13 ± 2) ratios were spatially homogeneous and lower than that apart from the dredging period. The fact that total Cu/total Pb is lower during the dredging period is due to an increase of total Pb without a significant change of total Cu. This emphasizes that sediment resuspension affects Pb contamination in the column water but is not the source of the Cu concentration in Toulon bay.

Concerning DGT-labile Pb, significantly higher concentrations were recorded during the dredging period at every site (one-way ANOVA, $p < 0.05$). In average, 32%, 20% and 64% increase were recorded for RS, DS and ODuS sites, respectively. This observation suggests an

increase of Pb concentrations in inorganic and weak organic complexes (labile fraction) during the dredging period.

The huge increase of total Pb at IDuS is correlated with an increase of total Pb at the three other sites (Figure B- 1). Furthermore, total, dissolved and DGT-labile Pb were higher (one-way ANOVA, $p < 0.05$) at RS, DS and ODuS during the dredging period which accentuates the key role of sediment resuspension due to dredging activities in Pb contamination. Nevertheless, other events may lead to a sediment resuspension. Indeed, the long-term stable spatial gradient observed apart from the dredging period clearly indicated that sediment resuspension was affecting the chemical quality of the water column with respect to the gradient of contamination in both the sediment and the water column.

III.3.4.4. Dredging accentuated the biological gradient of ultraplankton

The highest HP abundances observed during the whole survey were recorded within the geotextile, at IDuS. Moreover, at every site, a slight but significant (one-way ANOVA, $p < 0.05$) HP enrichment was recorded during the dredging period when compared to the period apart from the dredging (Figure III-11). HP enrichment was previously observed along sediment resuspension in experimental conditions (Goni-Urriza *et al.*, 2018), yet, our work transposes this observation *in situ* and reveals the influence of dredging activities on planktonic heterotrophic prokaryotes thanks to the sampling performed in the geotextile bag.

Regarding the ultraphytoplanktonic community, neither general increase nor decrease of the total abundance was observed (data not shown), and none of the four considered subgroups demonstrated noticeable variation during the dredging. At IDuS, while the total abundance was not different from outside (one-way ANOVA, $p > 0.05$), PPE abundance was on average the highest among all sites whereas SYN abundance was on average the lowest (Figure III-11). As a consequence, the structure shift observed along the south to north gradient was accentuated within the geotextile, suggesting that the dredging activity only accentuated the reference situation. Coclet *et al.* (2018) demonstrated by experimental approaches that such shift could be especially linked to trace metal contamination as well as to sediment resuspension. While trace metal addition led to a strong decay of the ultraphytoplanktonic community, exposition to sediment elutriate temporally promoted phytoplanktonic growth (Coclet *et al.*, 2018). Lafabrie *et al.* (2013) also reported similar

temporal stimulation of pico and nanophytoplanktonic groups. In the most contaminated areas of Toulon Bay, SYN cells were less abundant than in the less contaminated site, contrarily to larger PNE cells. This observation could highlight an influence of sediment resuspension on the ultraphytoplanktonic structure shift. The accentuation of the structure shift within the geotextile when compared to the closest site tended to comfort this hypothesis. Hence the spatial community structure shift observed in the long term in the shallow and enclosed Toulon Bay could be well linked to sediment resuspension, either wind-driven or human-related.

Although not determined in this study, the ultraphytoplanktonic biovolume must have been higher in the northern enclosed area and especially within the water since smaller SYN cells (≤ 1µm) were replaced by larger PPE cells (≥ 2 µm during this survey) without any variation in total cells number. As a consequence, higher photosynthetic production could explain the larger abundances of HP, which are known to strongly rely on phytoplanktonic resources in the marine environment (Williams *et al.*, 2013; Buchan *et al.*, 2014; Luria *et al.*, 2017). The role of sediment resuspension in providing organic resources for the HP community cannot be excluded since sediment resuspension can release significant organic carbon amounts (Guigue *et al.*, 2017), fueling microbial growth at short time scales (Goni-Urriza *et al.*, 2018). The respective influences of phytoplanktonic structure shifts and organic carbon release by sediment resuspension need further investigation to assess a potential trophic alteration of the planktonic food web by dredging activities, as observed in other coastal contexts (Jonsson *et al.*, 2017).

III.3.5. Conclusion

This long-term monitoring emphasized the stability of the previously observed spatial gradient of trace metals contamination in Toulon Bay. Moreover, although investigated here on a smaller area, the dominance of PPE over SYN in ultraphytoplanktonic community in the most contaminated sites also appeared stable in the long term. Temporal ultraphytoplankton and HP abundance dynamics however appeared to be driven by other parameters than trace metals contamination. During a rather long period, a dredging operation with variable intensity led to strong modifications of Cu and Pb concentrations. The used geotextile appeared efficient in preventing dumped sediment dispersion and water column

contamination by contaminated particles at a large spatial scale. However, in spite of the use of this geotextile, statistically significant increases in Pb concentrations and lability appeared affected at large spatial scale (several km away from the dredging and dumping sites) during the dredging operation. Moreover, although the ultraphytoplanktonic community structure spatial gradient was only slightly accentuated during the dredging, especially in the geotextile bag, a significant increase in HP abundance was recorded at a large spatial scale.

In the dumping site created for this dredging operation, the highest trace metals concentrations, the highest HP abundances and the highest PPE proportion were observed thus appearing to extend the upper limit of both chemical and biological gradients observed apart from the dredging period. Taken together, these observations point toward a strong influence of sediment resuspension in the ecological functioning of the highly anthropized Toulon Bay.

Higher temporal resolution is needed to elucidate the processes involved and to better decipher the exact contribution of a dredging operation on the water quality in a highly anthropized area where suspended matter is often high, independently from dredging operations.

Acknowledgment

This study was supported by SE.D.RI.PORT. (SEdimenti, Dragagi e RIschi PORTuali, Interreg Marittimo IT/FR 2017-2020, co-funded by the European Regional Development Fund) and MISTRALS-MerMex-WP3-C3A research programs, by the LASEM Toulon and the CARTT of the Institut Universitaire Technologique from Toulon University. N. Layglon PhD was partly funded by the Sud region and supported by the LASEM Toulon. C. Coclet PhD was funded by the Sud region and supported by Toulon Provence Méditerranée. The authors wish to thank the French Navy for sampling assistance as well as Dr Duc Huy Dang.This paper is dedicated to our friend and mentor, Cedric Garnier, an outstanding scientist who tragically passed away and without whom this work would not have been possible.

III.4. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'impact de la contamination en ETM sur l'abondance des procaryotes hétérotrophes (bactéries) et sur l'abondance et la structure des procaryotes et eucaryotes autotrophes (cyanobactéries et ultraphytoplancton) dans la colonne d'eau par cytométrie en flux a été étudié. Pour ce faire, les concentrations en ETM ont été mesurées ponctuellement (1 jour en 2014 et 1 jour en 2015) sur une cinquantaine de sites couvrant la totalité de la rade de Toulon et mensuellement durant 46 mois (de 2012 à 2017, comprenant une période de dragage) sur 5 sites.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence un gradient horizontal multiple de contamination en ETMs dans la colonne d'eau de la rade de Toulon, très marqué entre des sites distants de seulement quelques kilomètres et stable dans le temps. Les concentrations en ETM les plus faibles, proches du bruit de fond géochimique de la Méditerranée, ont été mesurées dans la grande rade ouverte sur le large. Les concentrations les plus élevées ont été observées dans les zones enclavées de la petite rade où se concentre la majorité des activités anthropiques. Les activités de dragage, entraînant la remise en suspension de sédiments contaminés, ont notamment participé à l'augmentation des concentrations en ETM, à la modification du partitionnement de Cu entre phases dissoute et particulaire et à la modification de la labilité de Pb dans la colonne d'eau.

Les gradients de contamination en Cd, Cu, Pb et Zn sont apparus très structurant, à la fois sur l'abondance des procaryotes hétérotrophes et sur l'abondance et la structure des organismes autotrophes (cyanobactéries et ultraphytoplancton). La première étude a démontré le rôle des ETM comme principal facteur structurant des communautés ultraplanctoniques, représentant une pression de sélection plus importante que les autres paramètres environnementaux (température, salinité, nutriments, etc.). Ainsi, l'abondance des procaryotes hétérotrophes et des picoeucaryotes autotrophes était plus élevée dans les zones très contaminées alors que *Synechococcus* était plus abondant dans les zones peu contaminées, ouvertes sur le large. Bien que l'influence du dragage semble limitée sur l'abondance et la structure des communautés ultraplanctoniques, il est apparu que des différences de sensibilité et de potentiel de résistance entre les groupes ultraplanctoniques

étudiés pouvaient être responsables des gradients biologiques observés dans la rade de Toulon en lien avec les gradients en ETM.

Ces deux études ont permis de mettre en évidence une multicontamination en ETM forte dans la rade de Toulon et un effet structurant sur les communautés ultraplanctoniques. Cependant, les résultats obtenus par des prélèvements ponctuels et mensuels ainsi qu'une approche en cytométrie en flux restent peu résolutifs et devaient être confirmés par des observations à une fréquence plus élevée et avec des méthodes analytiques plus informatives. C'est dans cette optique que le chapitre IV présentera l'analyse des communautés de bactérioplancton (procaryotes autotrophes et hétérotrophes) le long du gradient de multicontamination pendant un mois par une approche de séquençage haut débit.

CHAPITRE IV. INFLUENCE DE LA MULTICONTAMINATION EN ETM DE L'EAU SUR L'ABONDANCE ET LA DIVERSITÉ TAXONOMIQUE DES COMMUNAUTÉS DE PROCARYOTES PLANCTONIQUES

IV.1. Introduction du chapitre

Dans le chapitre précédent, des relations importantes entre des gradients de contamination forts et persistants dans le temps et les communautés ultraplanctoniques déterminées par cytométrie en flux dans la rade de Toulon ont été mises en évidence. Toutefois, la cytométrie en flux apporte peu d'informations sur la diversité taxonomique des communautés de procaryotes dans la colonne d'eau. De plus, les suivis ponctuels et mensuels réalisés dans les études précédentes n'ont pas apporté suffisamment de résolution pour pouvoir identifier des changements rapides des communautés en relation avec des variations temporelles des conditions environnementales et notamment des ETM. De nombreuses études ont montré que les communautés bactérioplanctoniques répondaient rapidement aux changements environnementaux tels que la salinité (Lozupone and Knight, 2007), la température (Fuhrman *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2009) et la disponibilité en nutriments (Fortunato *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2013). En revanche, les relations entre une contamination en ETM et la structure des communautés bactérioplanctoniques dans un environnement marin côtier sont très peu connues (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017). Ces relations peuvent être rendues complexes par une contamination multiple de la colonne d'eau entraînant des effets additifs, synergiques ou antagonistes (Lorenzo *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2007). Les effets des ETM sur les communautés de bactérioplancton sont aussi dépendants de l'hydrodynamisme et des conditions environnementales (Cloern, 2001). Enfin, les réponses fonctionnelles des communautés de bactérioplancton soumises à une contamination métallique sont à ce jour inconnues dans les environnements marins côtiers.

Dans ce contexte, ce chapitre est basé sur une étude de terrain d'un mois, réalisée en Juin 2015, avec des prélèvements hebdomadaires. L'abondance et la structure des communautés de procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées) et autotrophes (cyanobactéries) de surface et de fond déterminés par cytométrie en flux et par séquençage

à haut débit par Illumina Miseq d'un fragment du gène de l'ARNr 16S ont été principalement pris en compte. Pour cette étude, un jeu de données environnementales plus complexe, avec l'analyse de 25 ETM en plus du Cd, du Cu, du Pb et du Zn a été utilisé. Les principaux objectifs de cette étude étaientt : (i) d'étudier la variabilité spatio-temporelle de l'abondance, de la structure et des fonctions des communautés de procaryotes planctoniques dans la rade de Toulon et (ii) d'évaluer l'influence des principaux facteurs environnementaux, et plus particulièrement la contribution de la contamination en ETM, sur ces communautés.

IV.2. Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area

Cette partie est présentée sous la forme d'un article publié dans la revue *Frontiers in Microbiology* [Coclet et al., (2019). Frontiers in microbiology, 10, 257]. Les références sont toutes présentes dans la partie Références à la fin de ce manuscrit.

Clément Coclet[1,2], Cédric Garnier[1], Gaël Durrieu[1], Dario Omanović[3], Sébastien D'onofrio[1], Christophe Le Poupon[1], Mullot Jean-Ulrich[4], Jean-François Briand[2], Benjamin Misson[1,*]

[1] *Université de Toulon, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), UM110, France.*

[2] *Université de Toulon, MAPIEM, EA 4323, Toulon, France.*

[3] *Ruđer Bošković Institute, Division for Marine and Environmental Research, Bijenička 54, Zagreb, Croatia.*

[4] *LASEM-Toulon, Base Navale De Toulon, BP 61, 83800 Toulon, France.*

[*]: corresponding author; email: misson@univ-tln.fr; tel: +33 494 146 746; Université de Toulon, CS60584, 83041 Toulon Cedex 9

Originality-Significance Statement

Human-induced chemical contamination gradients challenge our understanding of microbial communities' ecology, especially in the very dynamic marine coastal environment. Through the spatio-temporal investigation of microbial diversity dynamics in a model ecosystem, this work highlights contributions of anthropogenic trace metal contamination to marine bacterioplankton ecology. Identify the key aspects of originality and significance that place the work within the top 10% of current research in environmental microbiology.

IV.2.1. Abstract

Unraveling the relative importance of both environmental conditions and ecological processes regulating bacterioplankton communities is a central goal in microbial ecology. Marine coastal environments are among the most urbanized areas and as a consequence experience environmental pressures. The highly anthropized Toulon Bay (France) was considered as a model system to investigate shifts in bacterioplankton communities along natural and anthropogenic physicochemical gradients during a one-month survey. In depth geochemical characterization mainly revealed strong and progressive Cd, Zn, Cu and Pb contamination gradients between the entrance of the Bay and the north-western anthropized area. On the other hand, low-amplitude natural gradients were observed for other environmental variables. Using 16S rRNA gene sequencing, we observed strong spatial patterns in bacterioplankton taxonomic and predicted function structure along the chemical contamination gradient. Variation partitioning analysis demonstrated that multiple metallic contamination explained the largest part of the spatial biological variations observed, but DOC and salinity were also significant contributors. Network analysis revealed that biotic interactions were far more numerous than direct interactions between microbial groups and environmental variables. This suggests indirect effects of the environment, and especially trace metals, on the community through a few taxonomic groups. These spatial patterns were also partially found for predicted bacterioplankton functions, thus indicating a limited functional redundancy. All these results highlight both potential direct influences of trace metals contamination on coastal bacterioplankton and indirect forcing through biotic interactions and cascading.

Keywords: Coastal ecosystem, metal contamination gradients, bacterioplankton community structure, functional prediction, co-occurrence network

IV.2.2. Introduction

Marine coastal areas are increasingly subjected to anthropogenic pressures that usually result in human-induced chemical contamination. Increasing demographic pressure and both terrestrial and marine activities threaten marine ecosystems (Halpern *et al.*, 2008; The Mermex Group *et al.*, 2011) Urban and industrial wastes (Levin *et al.*, 2001; Oursel *et al.*, 2013), biocides released by antifouling coatings (Turner, 2010) and fuel from nautical traffic (Callender, 2003) as well as historical pollution accumulated in the sediment compartment (Xu *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015) are well-known and widespread examples. Such chemical contamination represents an increasing threat for marine coastal areas, and microorganisms inhabiting these ecosystems (Misson *et al.*, 2016; Ben Othman *et al.*, 2017; Coclet *et al.*, 2018).

Microbial communities have been shown to be a major component of marine planktonic ecosystems (Fuhrman and Azam, 1980), variable across space (Pommier *et al.*, 2007; Ghiglione *et al.*, 2012) and time (Fuhrman *et al.*, 2006; Fortunato *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012). Multiple environmental factors are known to drive temporal and spatial dynamics in bacterioplankton, such as salinity (Lozupone and Knight, 2007), temperature (Fuhrman *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2009), depth (Treusch *et al.*, 2009), grazing and predation (Zubkov and López-Urrutia, 2003) and resource availability (Fortunato *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2013).

Bacterioplankton communities have been largely characterized spatially or temporally in various environments, but rarely assessed over both spatial and temporal scales in a marine coastal area. These ecosystems are usually characterized by natural gradients linked to the continent-sea interface and if anthropized by a complex set of chemical contaminants, potentially affecting marine microbial communities. The links between benthic microbial communities and trace metal contamination have been extensively revealed (Gough and Stahl, 2011; Pringault *et al.*, 2012; Quero *et al.*, 2015; Misson *et al.*, 2016). But how the marine bacterioplankton communities responds to trace metal exposure was scarcely investigated in coastal marine environments (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017). Moreover, chemical perturbation on bacterioplankton communities is supposed to be complex because multiple trace metallic contaminations of the water column can result in additive, synergistic or antagonistic effects (Lorenzo *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2007). Effects of trace metals can be

dependent of hydrology, seasonal and environmental conditions (Cloern, 2001). Furthermore, the impact of contamination on bacterioplankton may also be influenced by bacterio-phytoplankton coupling. Consequently, effects of contaminants on phytoplankton, which is sensitive to trace metal contamination (Coclet *et al.*, 2018) might have indirect consequences for bacterioplankton.

Despite several studies describing microbial taxonomic diversity in marine coastal environments, functional diversity has not been investigated intensely (Jeanbille *et al.*, 2016). Elucidating both taxonomic and functional diversity of microbial communities is the key to understand their roles in the ecosystem (Wang *et al.*, 2016). Recent studies have related functional diversity of microbial communities to specific habitats (Dinsdale *et al.*, 2008), water column zone (Louca *et al.*, 2011), seasonal changes (Ward *et al.*, 2017) and nutrient gradients (Lebrun *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2017). However, relationships between trace metal contamination and functional profiles related to taxonomy in seawater ecosystems are still lacking.

Trace metals contamination was studied in a number of previous studies where authors mention benthic (Pringault *et al.*, 2012; Besaury *et al.*, 2014; Misson *et al.*, 2016), phytoplanktonic (Ben Othman *et al.*, 2017) or freshwater communities (Wang *et al.*, 2018). This study represents the first comprehensive assessment of bacterioplankton communities living in a contaminated marine coastal ecosystem. We combined in-depth physicochemical and geochemical characterizations of Toulon Bay seawater (north-western Mediterranean Sea), flow cytometry microbial enumerations and 16S rRNA gene-based high-throughput sequencing water samples over a weekly sampling campaign (weekly during 2015, June). The objectives of the study were (i) to study both spatial and temporal patterns in bacterioplankton communities along the contaminated Toulon Bay, (ii) to reveal the main environmental factors driving bacterioplankton communities, more precisely the contribution of trace metals through direct or indirect effects; and (iii) to identify the predicted functional profile's response of bacterioplankton communities to chemical contamination in order to assess its influence on the ecosystem functioning.

IV.2.3. Materials and methods

IV.2.3.1. Study area and sample collection

Located in the south of France, Toulon Bay is divided into two basins by an artificial seawall: the Little Bay, which is semi-enclosed, and the Large bay, which opens onto to the Mediterranean Sea (Figure C- 1). The Little Bay is characterized by a high level of anthropic activities (Navy harbor, ferry transport, industries, wastewater sewage and aquaculture). Due to its location, the Little Bay is directly impacted by pollution and is less affected than the Large Bay by offshore hydrodynamics. This confers to the Little bay a higher trace metal contamination than the Large Bay as demonstrated previously in the sediments and with punctual measurements in the water column (Tessier *et al.*, 2011; Coclet *et al.*, 2018).

Sampling was performed weekly from June 1st to 29th June, 2015. Two liters of seawater from the surface (1m depth) and the bottom (1m above sediment) of the water column were sampled at five sites across Toulon Bay (North-Western Mediterranean Sea, France), from the entrance of the bay to the north-western anthropized area (Figure C- 1 and Table C- 1). After the T1 sampling in site 41p, the French Navy performed an exercise that could have modified the water quality. In order to check that, we sampled again the water (T1b). The 5 sites were chosen to cover the whole range of dissolved metal contamination on the basis of trace metal distribution previously evaluated in Toulon Bay surface seawater (Coclet *et al.*, 2018) (Figure IV-1). Water samples were stored in a cooler and filtered through 0.2 µm polycarbonate membranes (Millipore). Filters were stored at -80°C until DNA extraction. Physico-chemical parameters including metals were weekly analyzed during the sampling period in order to characterize the environment (details in ANNEXE C). Standard oceanographic properties, including water temperature (°C), salinity, O_2 ($mg.L^{-1}$ and %), pH, and chlorophyll *a* (chl*a*) ($\mu g.L^{-1}$) were measured on sites using a multi-parameter probe (Hydrolab DS5, OTT).

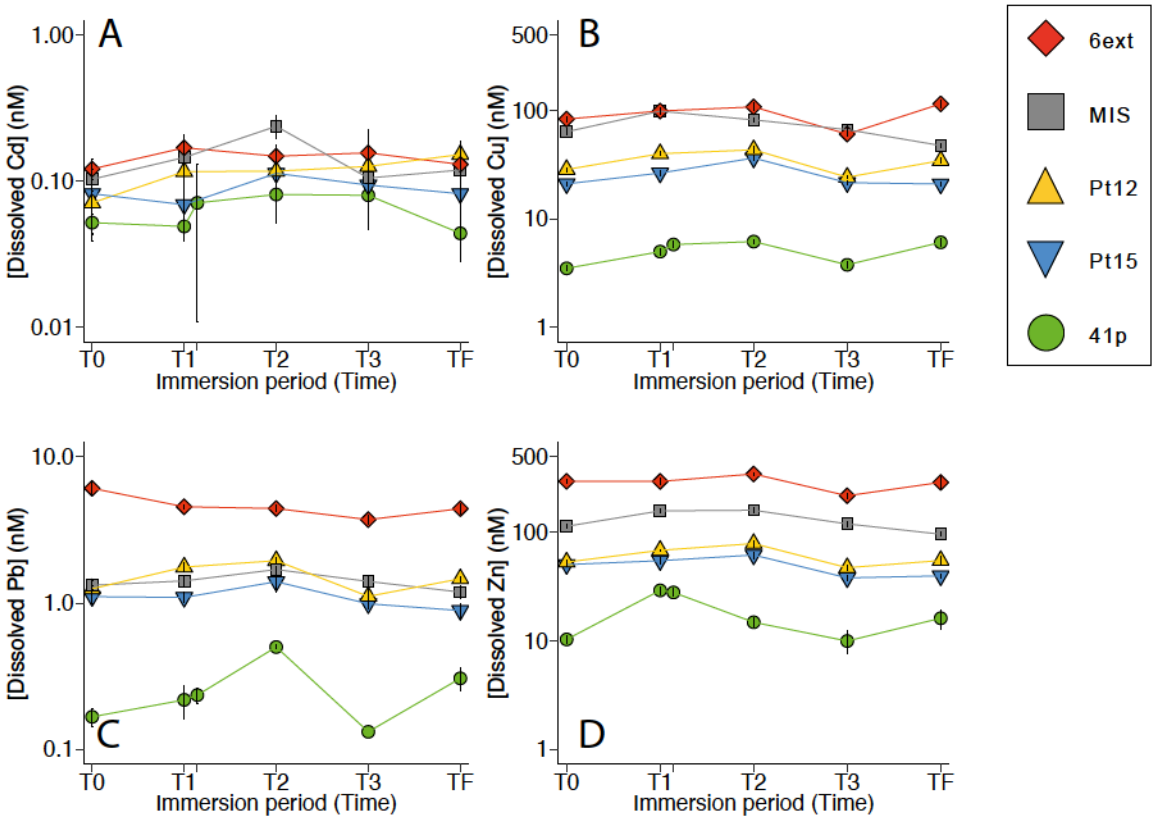


Figure IV-1 Dynamics of dissolved trace metals concentrations in surface seawater at the different sampling stations. Symbols and errors bars represent average and standard deviation, respectively.

IV.2.3.2. Bacterial community abundance by flow cytometry

Subsamples of 10 mL of seawater were sampled at each site, depth and date, filtered through a 90 µm nylon mesh, fixed with 0.25% (final concentration) glutaraldehyde on field and stored at -80°C until flow cytometry analysis. Autotrophic prokaryotes (*Synechococcus*-like*),* eukaryotic phytoplankton (picoeukaryotes and nanoeukaryotes) populations were characterized and enumerated using a BD Accury™ C6 (BD Biosciences) flow cytometer, as previously described (Coclet *et al.*, 2018). Heterotrophic prokaryotes were enumerated after staining with SYBR Green as previously described (Cabrol *et al.*, 2017).

IV.2.3.3. Bacterial community composition

DNA was extracted from the Millipore filters by a combination of enzymatic cell lysis (Ghiglione *et al.*, 2009) and AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The protocol for the DNA extraction and the library preparation is fully described in ANNEXE C. We assessed bacterial community composition (BCC) by targeting the V4-V5 region of the 16S rRNA gene (Parada *et al.*, 2016) and using Illumina Miseq 2 x 250pb paired-end sequencing (Genoscreen, France).

Sequences were then demultiplexed and assigned to corresponding samples using CASAVA (Illumina). Forward and reverse reads were merged using PEAR 0.9.8 with default options (J. Zhang *et al.*, 2014). Raw sequences were analyzed using MacQiime v.1.9.1 software (Caporaso *et al.*, 2010). Briefly, barcode, primer, shorter sequences (<100 bp in length) and sequences with ambiguous base calls or homopolymer runs exceeding 10 bp were removed. The remaining sequences were assigned to operational taxonomic units (OTUs) and clustered at a 97% threshold using Uclust algorithm (Edgar, 2010), both closed and open reference OTU picking, based on the SILVA (release 128) database (Pruesse *et al.*, 2007; Quast *et al.*, 2013). Low abundance OTU (<0.005%) were filtered as recommended by Bokulich *et al.* (2013). Sequences classified as mitochondria or chloroplast were removed from the OTU table, corresponding to 3393 OTUs. A total of 349 009 reads were finally obtained representing 31 132 OTUs. OTU table was normalized by random subsampling to the smallest number of sequences (*i.e.* 4044). Samples with lower number of sequences were discarded (n = 16), 36 samples were remaining for following analyses (Table C- 1). The 16S rRNA gene sequences have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under BioProject ID PRJNA514222 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/10721482).

IV.2.3.4. Data analysis

All plots and statistical analysis were done in R RStudio (R Core Team, 2017). Alpha diversity calculations and error estimates were averaged, using QIIME script *core_diversity_analyses.py* (Caporaso *et al.*, 2010), including estimates of rarefaction, Chao1, equitability, Shannon and Simpson's diversity. In order to compare the sites based on their chemical composition, taxonomic and functional community profiles, seawater samples were sorted in a nonmetric

multidimensional scaling (NMDS). Pairwise dissimilarities were calculated using Bray-Curtis metrics. Each resulting dissimilarity matrix was used to visualize sample differences via NMDS ordination using the "vegan" package in R (Oksanen *et al.*, 2016). To test the null hypothesis that there was no significant difference between the groups discriminated according to sampling stations, sampling dates and depth, similarities were analyzed by global and pairwise PERMANOVA tests, using "vegan" and "RVAideMemoire" packages, respectively.

To identify taxa that discriminated the sampling sites, the linear discriminant analysis (LDA) effect size method (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011) was used. This was performed with the LEfSe online tool in the Galaxy framework, using all default setting for data formatting and LDA effect size (Goecks *et al.*, 2010). A similarity percentage (SIMPER) was run with a 90% cutoff and used to rank the percent contribution of individual biomarker to the dissimilarity between site differences (Clarke, 1993).

To investigate the relationships between BCC and measured environmental variables, Spearman rank correlation analysis and redundancy analysis (RDA) were performed using the "vegan" package in R (Oksanen *et al.*, 2016) (ANNEXE C). Briefly, for variable reduction and in order to create an efficient model from the most significant explanatory variables, vegan's ordistep function were applied and among the 31 explanatory variables, 20 significant variables ($P<0.05$) were kept for the following analyses The RDA model was tested by performing partial RDA, and variation partitioning to test the significance of the contribution of both groups of variables and each individual variable.

Interactions among the OTUs and between these OTUs and the 31 environmental variables were evaluated using CoNeT (Cooccurrence Network) plugin 1.1.1.beta (Faust *et al.*, 2012), a plugin in a Cytoscape software 3.4.0. A similarity matrix was built with different metrics (Spearman correlation and Kullback-leibler distance and a mutual information score) from OTUs. This initial network was re-defined by randomization. A permutation matrix representing a null distribution was obtained by resampling OTUs as described in Faust *et al.* (2012). In a permutation step, edge specific *p-values* were computed; however, for the final network, *p-values* of an edge were merged into one *p-value* according to Brown's method. In the final step, the Benjamini-Hochberg multiple testing correction was applied ($P < 0.05$). Network characterization was evaluated using betweenness centrality (BC) and closeness centrality (CC) (ANNEXE C). Highly connected clusters were identified using the MCODE plugin

version 1.4.0.beta2 (Smoot *et al.*, 2011). Network characterization were evaluated using different topological indexes generated by Network Analyzer plugin.

Functional profiles were predicted from obtained 16S rRNA gene data using Tax4Fun (Aßhauer *et al.*, 2015) based on KEGG category.

IV.2.4. Results

IV.2.4.1. General characteristics of Toulon Bay seawater samples

An increase in the trace metal concentrations was rationally observed from a reference site open on the sea with low metal concentrations (41p) to enclosed sites in the most anthropized area (MIS and 6ext) with high level of contaminations (Figure IV-1). The highest trace metal concentrations found in surface seawater were Zn, Cu, Pb and Cd, while other metals/metalloids (As, Ba, Be, Cs, Cr, Mn, Sb, Sn, Ti, U and V) were kept to concentration levels close to the geochemical background (Figure IV-1and Table C- 2). At the surface of seawater, Cd, Cu, Zn and Pb concentrations were 6, 33, 35 and 48 times higher in 6ext water than in 41p water, respectively. These enrichment factors were quite similar (8, 25, 43 and 73 times) at the bottom of the seawater (Figure C- 2). For both surface and bottom seawater, the concentrations of trace metals/metalloids were relatively stable during the sampling period (Figure IV-1, Figure C- 2, and Table C- 2). The most contaminated sites MIS and 6ext were significantly discriminated from the reference site 41p (PERMANOVA, $P < 0.01$) (Figure C- 3A) and from sampling date (Figure C- 3B) but not with depth (Figure C- 3C).

Seawater temperature increased gradually during the studied period at all five sites, from 18.8°C-21.2°C in T0 to 22.0°C-24.3°C in TF (Figure C- 4). Additionally, temperature was lower (1.9 ± 0.04°C) in bottom than in surface seawater. Surface salinity levels demonstrated low variations (38.4 ± 0.11). A very punctual drop was recorded in all sites at T2, down to 36.7 in MIS (Figure C- 4). Chlorophyll *a* in surface seawater were lower in 41p (0.16 to 0.31 $mg.L^{-1}$) than in other sites (0.59 to 2.08 $mg.L^{-1}$). Additionally, chlorophyll *a* concentrations peaked in all sites at the middle of the survey. Except for 41p, chlorophyll *a* concentrations were higher at the bottom seawater than at the surface (Figure C- 4). On average, in surface seawater, higher concentrations of DOC were found in 6ext (1.4 ± 0.07 $mg.L^{-1}$) compared to 41p (1.2 ± 0.06 $mg.L^{-1}$) (Figure C- 4). Similarly, higher concentrations of TN were found in MIS (0.15 ± 0.02

mg.L^{-1}) compared to 41p. (0.08 ± 0.02 mg.L^{-1}) (Figure C- 4). No significant difference was found in dissolved oxygen concentrations (mg.L^{-1} and %), and pH between both all five sites and all sampling date (Table C- 2). NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations of were below the detection limit (0.02 µM and 0.020 µM, respectively) in a majority of samples. As a consequence, they are not presented and will not be considered further.

IV.2.4.2. Bacterial community dynamics

Heterotrophic bacterioplankton abundances estimated using flow cytometry are shown in Figure C- 5. We observed an increase in the bacterioplankton abundance from the reference site 41p (3.8 x 10^5 to 4.2 x 10^5 cell.mL^{-1}) to the most enclosed site 6ext (8.0 x 10^5 to 1.4 x 10^6 cell.mL^{-1}) in both surface and bottom seawater. Additionally, heterotrophic bacterioplankton abundance was stable in 41p during the experiment whatever the depth, while strong dynamic was observed in both surface and bottom 6ext seawater, with highest abundances in T2 and T3, respectively.

Over the sampling, observed richness and Chao1 index (Figure C- 6) were significantly higher in the uncontaminated site 41p and declined to less than half compared to 6ext (ANOVA, $P < 0.01$). In contrast, Shannon, Simpson and evenness indexes did not significantly vary between sampling sites (Figure C- 6).

NMDS results showed a significant segregation of bacterioplankton communities between both sampling sites (PERMANOVA; R^2: 0.46; $P = 0.001$) and dates (PERMANOVA; R^2: 0.17; $P = 0.024$) but not with depths (PERMANOVA; R^2: 0.002; $P = 0.983$) (Figure IV-2A and Table C- 3). More precisely, pairwise PERMANOVA tests (Table C- 3) confirmed significant differences between the reference 41p site and all other sites (PERMANOVA; $P < 0.05$) and significant differences between 6ext and Pt12-Pt15 (PERMANOVA; $P < 0.05$).

The most abundant phyla (> 1% of all sequences across all samples) were *Proteobacteria* (53 ± 1.1%), followed by *Bacteroidetes* (28 ± 1.1%), *Cyanobacteria* (9.1 ± 0.7), *Actinobacteria* (6.1 ± 0.6), and *Verrucomicrobia* (3.0 ± 0.3%). At the family level (Figure IV-2B), *Flavobacteriacea* comprised the majority (22 ± 1.1%) of the total sequences, followed by *Alphaproteobacteria* groups SAR11 Surface 1 clade (18 ± 1.1%), *Rhodobacteraceae* (13 ± 0.65%) and SAR116 clade (6.1 ± 0.49%). *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, and *Verrucomicrobia* phyla were dominated by *Synechococcus* Family I (9.1 ± 0.72%), *Microbacteriaceae* (4.9 ±

0.71%), and *Puniceicoccaceae* (1.7 ± 0.19%). Archaea represented less than 0.1% of the total sequences, thus they were considered as "Others" in this study and variations of this group have not been taken into consideration.

Clear shifts in the relative abundance of individual bacterioplankton OTUs were observed between sampling sites. Using LEfSe analysis, we determined 43 differentially abundant taxa between four sites. 41p and 6ext, the two most geochemically contrasted sites, exhibited the highest number of taxonomic indicators (25 and 6, respectively) (Figure IV-3). For 41p site, the most significantly enriched bacterioplankton sequences were Acidimicrobiia *Candidatus Actinomarina*, members of the family SAR406, 7 Alphaproteobacteria OTUs and Gammaproteobacteria *Thiotrix*. Actinobacteria *Candidatus Aquilina* and both Flavobacteriia *Formosa* and Betaproteobacteria *Hydrogenophilaceae* were found to be overrepresented in MIS and 6ext, respectively. SIMPER analysis revealed that, on average, 13 biomarkers were identified as major contributors to differences between sites detected in the NMDS. The higher number of biomarkers identified as major contributors was found between 41p and the other sampling sites (between 17 and 32 biomarkers) (Table C- 4). Overall, each biomarker contributed to at least 1% of the dissimilarity between sites. *Candidatus Aquilina*, PS1 clade, NS7 marine group, *Planktomarina* and *Tenacibaculum*, notably, drove together more to 32% of disparity between cluster 41p and the other clusters (Pt15, 6ext and MIS).

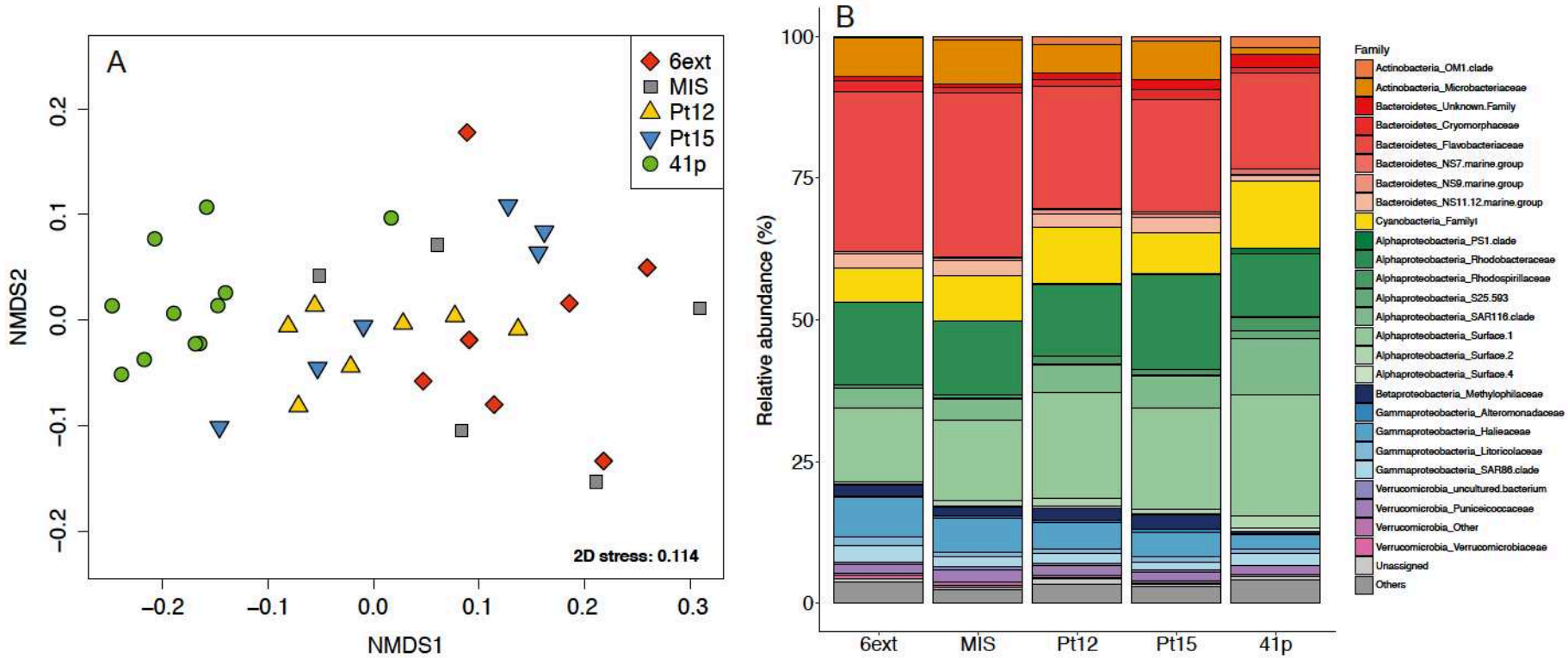


Figure IV-2 Spatial variations of bacterioplankton community structure. (A) Non-metric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray–Curtis dissimilarity for 16S rRNA gene libraries between the different sampling sites. Each symbol corresponds to a distinct site, time, and depth point. (B) Bar plot showing the average family-level contribution for each site. Families that on average comprised less than 1% of the libraries are grouped as "Others." Colors indicate different classes within phyla.

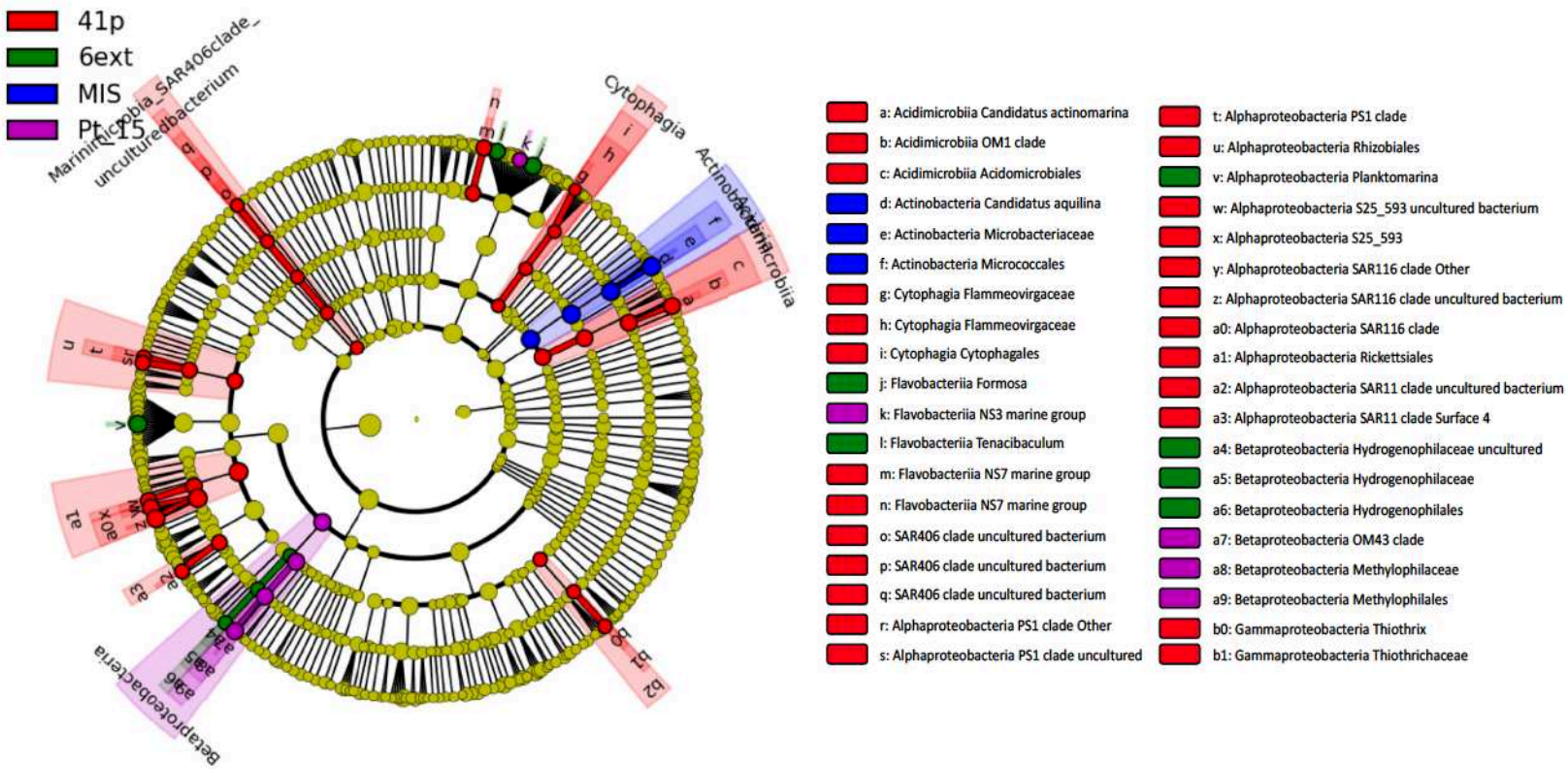


Figure IV-3 Taxonomic tree generated using LefSe analysis ($P < 0.05$, LDA effect size > 2) highlighting the biomarkers that statistically differentiate sampling sites. No biomarker was evidenced for the sampling site Pt12. The roots of cladogram stand for the domain (*i.e.* Bacteria and Archaea), and concentric circles represent the following taxonomic levels until the tips standing for genera.

IV.2.4.3. Bacterial community composition (BCC) in relation with environmental variables

Among the 31 environmental variables available for multivariate analysis, 20 parameters were selected by pairwise correlations. The first and the second axes of RDA captured 47.1% and 6.4% of BCC variance, respectively (Figure IV-4A).

Variation partitioning provided more details about the relative contributions of nutrients, contaminants, terrigenous and "others" factors in the observed spatial changes in BCC (Figure IV-4B). The combination of the four sets of explanatory variables explained 41% of BCC variation across sites. Among the set of explanatory variables, contaminants were the main contributors to variations in BCC (30%). Contaminants also appeared to have significant influence on BCC through their interaction with the other sets of variables. The contribution of terrigenous (19.6%), nutrient and biotic (15.0%) and "marine tracers" (21.6%) variables were also significant but to a lower extent than the contribution of contaminants variables. The highest individual contributions were attributed to Mn (1.2%), DOC (1.2%), salinity (1.1%), Zn (1.1%), and Cd (1.0%) (Table C- 5). Thus, among the five explanatory variables which contributed the most to the biological variation, 3 variables were contaminants (Mn, Cu, and Cd).

Network analysis resulted in a global network representing 158 OTUs and 21 environmental variables significantly connected. Among 1664 edges, 92% were inter taxa edges and 8% represented taxon-environment interactions. Most of the connections (67%) corresponded to negative interactions. To visualize the results, eight subnetworks were extracted from the global network (Figure IV-5 and Figure C- 7).

Globally, by plotting BC vs CC, 12 OTUs with the highest values for both parameters (arbitrarily determined as BC > 0.02 and CC > 0.5) were selected, representing putative keystone species within Toulon Bay (Table C- 6). Both of these indices indicate that SAR11 Surface 1 clade and *Rhodobacteraceae* (Alphaproteobacteria), *Synechococcus* (Cyanobacteria), *Candidatus Aquiluna* (Actinobacteria) and *Balneola* (Bacteroidetes) were central in this network. Most of Alphaproteobacteria, including SAR11, SAR116 and *Rhodobacteraceae,* and Cyanobacteria *Synechococcus* were positively correlated with each other, but negatively correlated with Bacteroidetes (NS11-12 and NS5 marine group, *Cryomorphaceae* and *Balneola*) and Actinobacteria (*Candidatus Aquilina*).

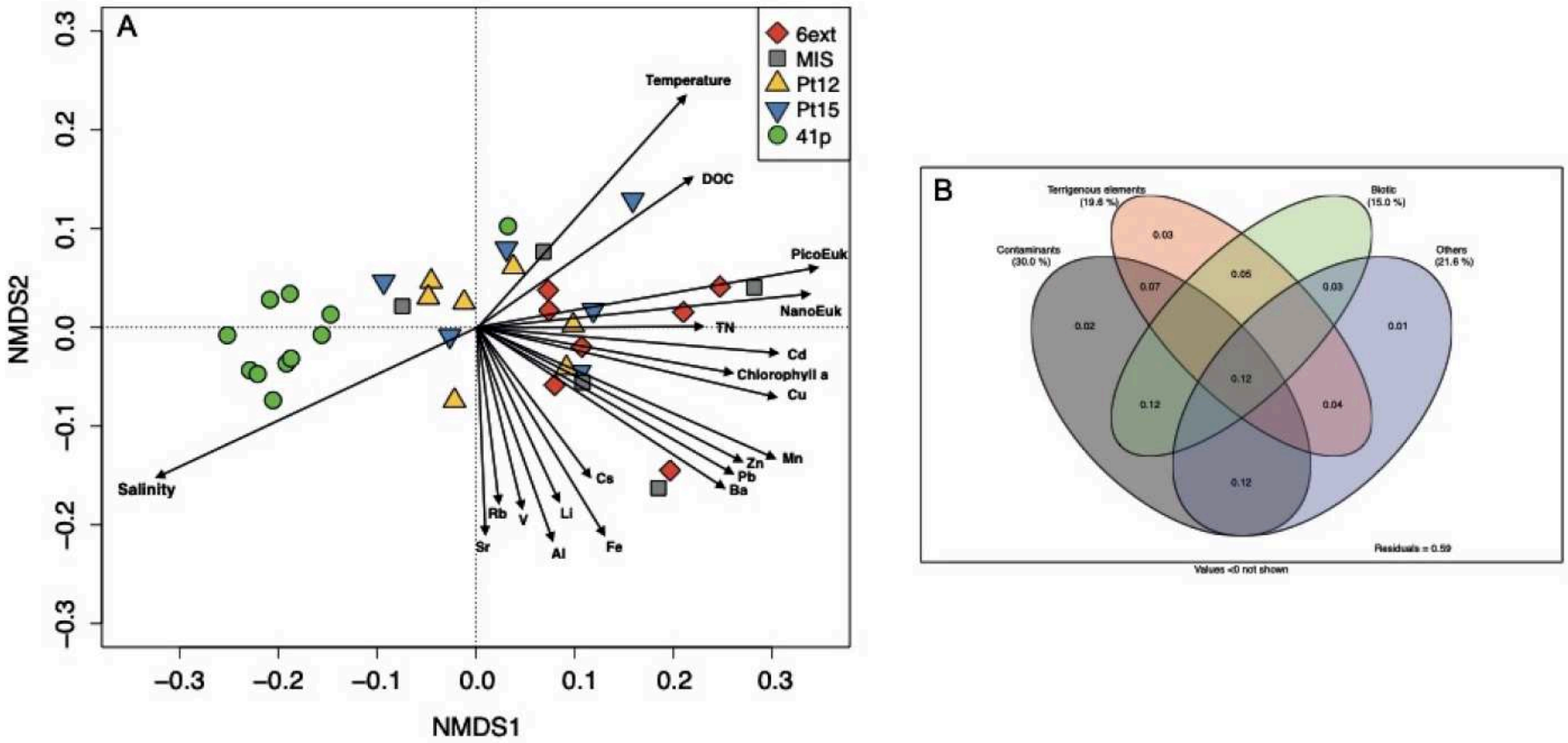


Figure IV-4 Contributions of environmental variables to spatial differentiation in bacterioplankton community structure. (A) Redundancy analysis (RDA) ordination diagram of the first two axes for bacterioplankton community composition. The percentage of the spatial variation in community structure explained by each axis is indicated in parentheses after the axis label. The constrained sets of environmental variables analyzed are indicated as vectors. NanoEuk: Nanoeukaryote abundance; PicoEuk: Picoeukaryotes abundance. (B) Venn diagram showing the variation partitioning (%) of the spatial variations in bacterioplankton community structure among four environmental datasets (Contaminants, Terrigenous elements, Marine tracers, and Nutrient and Biotic).

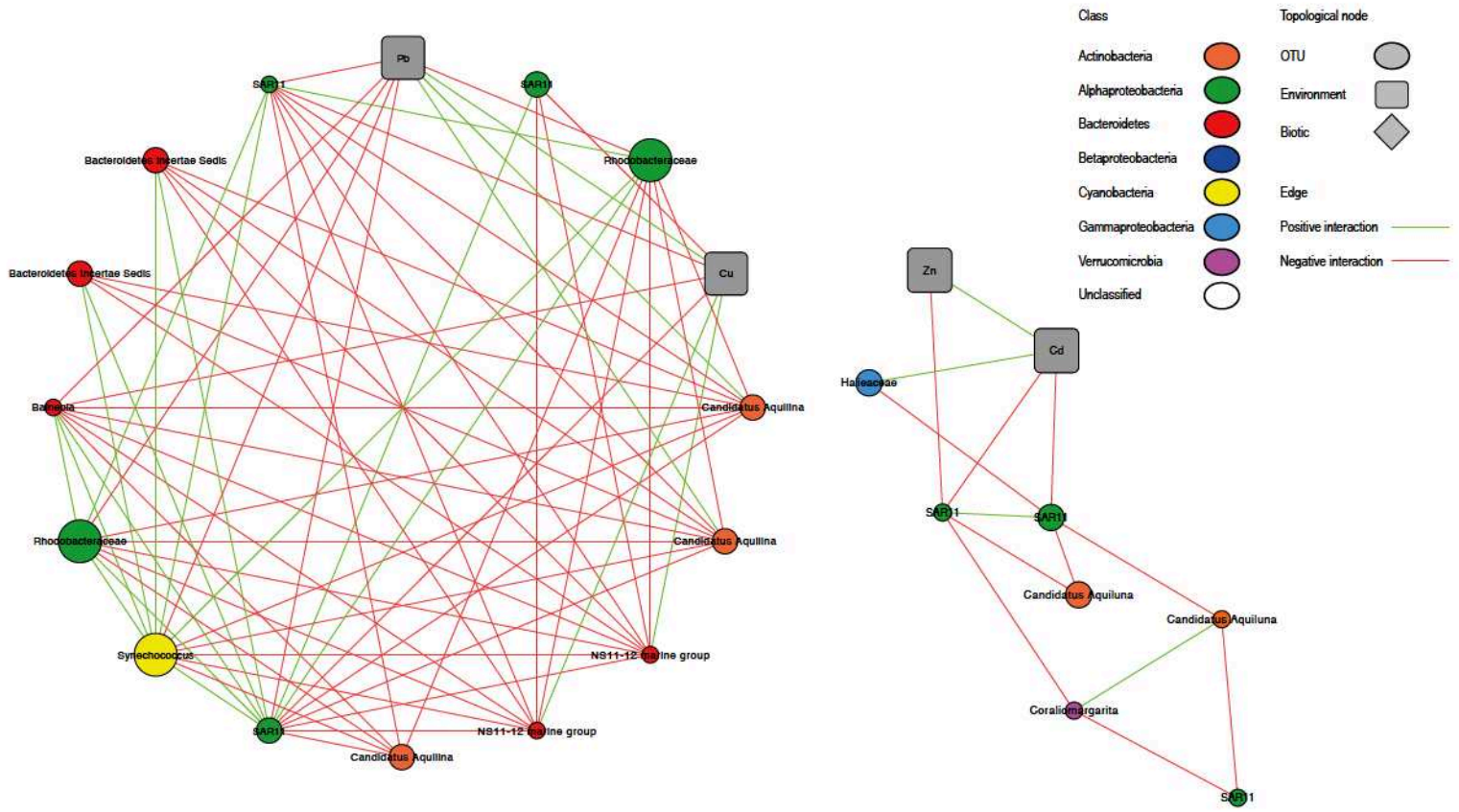


Figure IV-5 Co-occurrence subnetworks of bacterial taxa and environmental variables derived from the OTU table and showing only statistically significant correlations. Node size correspond to the relative abundance of the OTU. Nodes colors correspond to main bacterioplankton classes. Green and red lines represent positive and negative correlations, respectively.

In the subnetworks, there were 19 correlations with contaminants (8 with Pb, 6 with Cu, 3 with Cd and 2 with Zn) and 2 correlations with chlorophyll *a*. Several taxa that were identified as being key drivers of community dissimilarity using LEfSe analysis were highly correlated to contaminants. In particular, the Alphaproteobacteria *Rhodobacteraceae* and SAR11, the Bacteroidetes *Balneola* and the Cyanobacteria *Synechococcus* showed negative correlations with at least one of the contaminants (Cd, Cu, Pb or Zn). Conversely, Actinobacteria *Candidatus aquilina* and Bacteroidetes NS11-12 marine group were positively correlated with Pb and Cu, respectively. Gammaproteobacteria *Haliaceae* was positively correlated with Cd.

IV.2.4.4. Bacterioplankton predicted functional capabilities of microbial communities

The functional profiles of bacterioplankton communities was predicted using Tax4Fun (Wemheuer *et al.*, 2018). Predicted functions were classified as KEGG orthologs (KOs) resulting in the identification of 3619 KOs across all samples, using on average, 60 ± 12% of total OTUs (Table C- 7). Clustering showed that the differentiation of the sampling sites based on microbial predicted function profiles followed the chemical gradient described earlier, from the reference site towards the most enclosed and contaminated 6ext site (Figure IV-6). Compared to the uncontaminated site (41p), used here as a reference, some KEGG pathways seemed overrepresented in contaminated sites: Carbohydrate metabolism, Xenobiotics biodegradation and metabolism, Metabolism of terpenoids and polyketides. Other KEGG pathways were found to be underrepresented as “Cell growth and death”, “Nucleotide metabolism”, “Energy metabolism” and “Metabolism of cofactors and vitamins”.

IV.2.5. DISCUSSION

Bacterioplankton community composition and associated functions in highly metal contaminated ecosystems were scarcely studied (Nayar *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2005; Pringault *et al.*, 2016), even less using NGS techniques (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017). This study was performed in a multicontaminated coastal area, Toulon Bay, which presents far wider contamination gradients than natural environmental gradients. By combining seawater physicochemical and geochemical analyses with patterns of bacterioplankton

diversity and predicted functions, we provide an innovative insight into bacterioplankton ecology allowing to better understand how trace metals could shape communities.

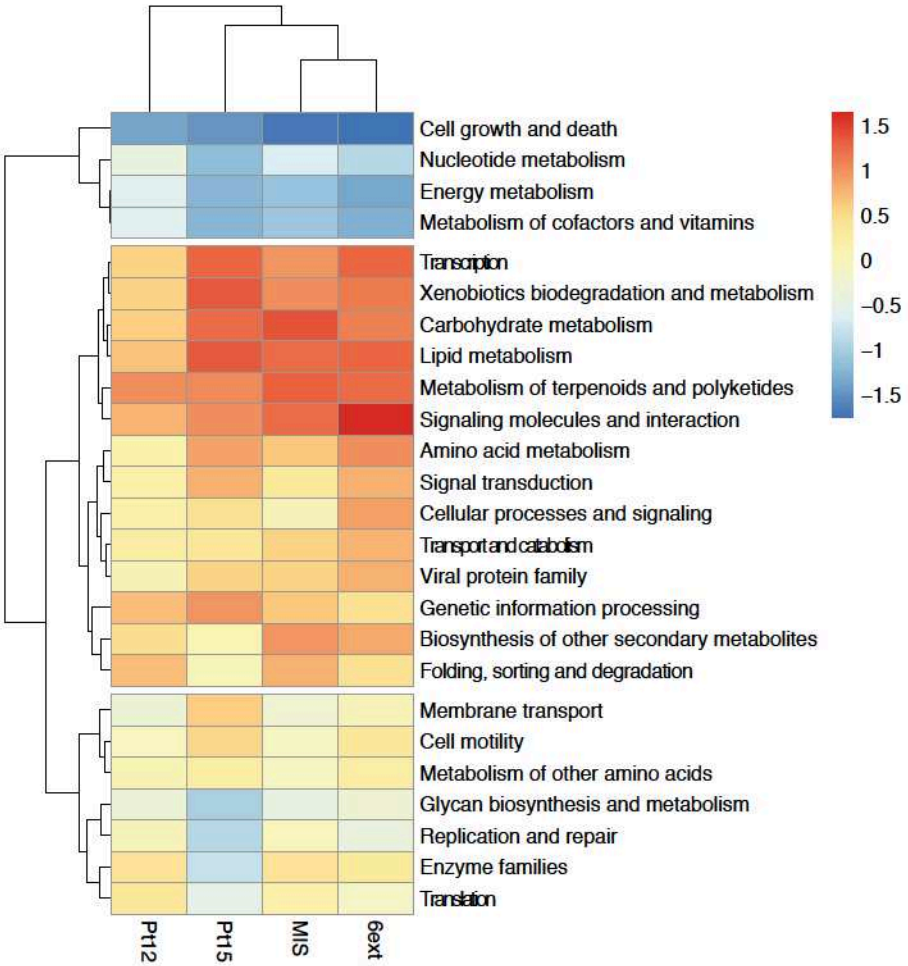


Figure IV-6 Heatmap based on the main KEGG pathways predicted at the different sampling sites. Frequencies of predicted KEGG categories were normalized with reference to the uncontaminated site 41p. Enrichments correspond to the positive values and red colors, depletions correspond to negative values and blue colors.

IV.2.5.1. Trace metal contaminations as drivers of bacterioplankton communities

Marine coastal areas are seen as valuable sentinel ecosystems, providing signals that reflect anthropogenic chemical pollution (The Mermex Group *et al.*, 2011). Concentrations of trace metals in the Toulon Bay were found to be at least comparable or higher to those reported in aquatic ecosystems receiving high contamination loads (Boyd *et al.*, 2005; Pringault *et al.*, 2012). The high enrichment factors (6- to 234-fold) compared to the geochemical background

of the Mediterranean Sea (Morley *et al.*, 1997) indicated significant anthropogenic inputs that could be attributed to numerous recent (*e.g.* large boat traffic, harbour activities, antifouling coatings) (Turner, 2010) and historical events (2nd World War) (Tessier *et al.*, 2011). Thus, we hypothesized a potential effect of trace metals on the bacterioplankton communities.

As previously reported in coastal waters (Nayar *et al.*, 2004; Caroppo *et al.*, 2006; Pringault *et al.*, 2016), bacterioplankton was more abundant in the most contaminated zones (MIS and 6ext) than in the uncontaminated site 41p. Bacteria have been reported to have a wide range of metal detoxification or resistance mechanisms by sequestering, excluding or precipitating metals (Nies, 1999). The higher abundance in contaminated sites could therefore suggest that the community is well adapted. Moreover, bioavailability of trace metals could also contribute to explain the absence of bacterioplankton abundance decrease in the most contaminated sites in term of abundance. Trace metals bioavailability is strongly controlled by the presence of dissolved organic ligand, especially in marine waters (Louis, Garnier, Lenoble, Omanovic, *et al.*, 2009; Bruland *et al.*, 2013). We considered here DOC concentrations and the dissolved fraction of trace metals, which is closer to the bioavailable fraction than the total concentration (Paquin *et al.*, 2002; Cindrić *et al.*, 2017) and consequently allow a more reliable assessment of their roles. Nevertheless, we neither evaluated the speciation of the main trace metals nor DOC composition in this study. More work will be thus needed to state about the respective contributions of bioavailability modulation and community adaptation in the bacterial abundance increase in Toulon Bay.

While bacterioplankton diversity did not show any significant trend along the contamination gradient, the community richness (Chao1 index) was shown to decrease progressively from the uncontaminated site (41p) towards the most contaminated sites (MIS and 6ext). A similar pattern was observed in South–Eastern Australia in metal- and PAH-contaminated sediments (Sun *et al.*, 2012) as well as in contaminated sediments in the Northern Adriatic Sea (Korlević *et al.*, 2015). This may be interpreted in light of classis disturbance theory that predict that in highly disturbed ecosystems, richness would decrease and a few species would dominate (Allison and Martiny, 2008; Odum, 2013). As a matter of fact, sensitive species are expected to be lost whereas tolerant species benefit from emptying ecological niches (Atlas *et al.*, 2015). Thus, the multi-contamination appeared to have disruptive effect on the alpha diversity of the bacterioplankton communities.

Gillan *et al.* (2005) demonstrated that alpha-diversity alone is a poor indicator of ecosystem stress in chronically polluted systems, as the proliferation of new tolerant species can lead to a recovery of the diversity. As in many coastal sites, microbial assemblages in our study were dominated by a few families *Flavobacteriaceae*, SAR11 Surface 1 clade, *Rhodobacteraceae*, SAR116 clade, *Synechococcus* Family I and *Microbacteriaceae*. This is a core of generalist families in marine seawater and its members have been found abundant in numerous other marine coastal studies (Chow *et al.*, 2013; Cram *et al.*, 2015). Despite overall similarities, BCC was strongly affected by trace metal contamination, the five sampling sites clearly exhibited distinct microbial community's structures, along low-to-high contamination continuum. This observation is also in agreement with the disturbance hypothesis, as discussed for alpha diversity, and tends to complement previous observations of the structural role of contaminants for bacterioplankton in other coastal areas (Pringault *et al.*, 2016; Goni-Urriza *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

The uncontaminated site (41p) was characterized by higher relative abundances of OM1 clade (Acidimicrobiia), SAR11, Rickettsiales, Rhizobiales and Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), Thiothrichaceae (Gammaproteobacteria) and *Synechococcus* (Cyanobacteria). Correspondingly, a number of previous works reported that *Synechococcus* were sensitive to high trace metal levels (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014; Coclet *et al.*, 2018). Additionally, SAR11, Rickettsiales, Rhizobiales and *Synechococcus* are well known to be characteristic of marine zones away from anthropogenic influence (Gilbert *et al.*, 2009, 2012; Fuhrman *et al.*, 2015).

The most contaminated sites (MIS and 6ext) were enriched in *Candidatus Aquiluna* (Actinobacteria), *Formosa* and *Tenacibaculum (*Flavobacteriia) as well as one from Sphingobacteriales NS11-12 marine group (Bacteroidetes). Networks analysis showed also that *Planktomarina* (Alphaproteobacteria)*, Hydrogenophilaceae* (Betaproteobacteria) and Halieceae (Gammaproteobacteria) were positively associated with contaminants, in agreement with the distribution of these groups along the contamination gradient. Previous studies in freshwater or marine sediment reported that *Hydrogenophilaceae* and *Candidatus Aquiluna* (Microbacteriaceae) were positively correlated to high trace contaminant levels (Acosta-González *et al.*, 2013; Garris *et al.*, 2018). The increase of Actinobacteriia and Betaproteobacteria in the most contaminated site was not unexpected, as they are widely recognized to play a key role in oil degradation (Acosta-González *et al.*, 2013) and heavy metals

transformation, especially, in the case of nutrient enrichments (Garris *et al.*, 2018). Microbacteriaceae (Actinobacteria) were widely reported as members of highly copper-polluted sediment (Besaury *et al.*, 2014) or Zn-polluted freshwater (Ni *et al.*, 2016). (Albarracín *et al.*, 2010) have shown that Actinobacteria members isolated from copper-contaminated sediment are able to significantly diminish the bioavailable copper throughout bioaccumulation. Members of the Bacteroidetes members, especially *Flavobacteria* families are also known to represent one of the most abundant groups of bacteria in coastal areas, especially in contaminated sites due to their ability to tolerate toxic effects of certain metals (Sun *et al.*, 2013; Korlević *et al.*, 2015). The Bacteroidetes NS11–12 marine group have been detected mainly in marine habitats (Meziti *et al.*, 2015), unfortunately without clear ecological implications. At a finer scale, for most of clusters, members of both Alphaproteobacteria (mainly SAR11) and Bacteroidetes (mainly *Flavobacteriia*) groups describe above, exhibit the highest number of edges with high level of connections within each group in the network analysis. These important findings display that Alphaproteobacteria would highly influence the functioning of low contaminated site while Bacteroidetes would highly influence the functioning of contaminated zones.

Most of studies on bacterioplankton communities have focused on community diversity and composition responses to perturbation (Jeffries *et al.*, 2016). The effect of chemical contaminations on bacterial community functionalities have only been investigated in freshwater ecosystems (Sjöstedt *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). In a highly polluted area such as Toulon Bay, the functional stability of microbial communities could be challenged. Major predicted bacterial functions including those necessary to basic metabolisms were conserved across the chemical gradient. Functional recovery occurred because of species replacement or change in relative abundance of taxa, *i.e.* functionally redundant rare species could become abundant in response to the contaminations. This is in agreement with the replacement scenario (Comte and Del Giorgio, 2011), and previous findings showing that the rare biosphere is an important reservoir for recruitment of bacterial taxa during environmental change (Sjöstedt *et al.*, 2012; Comte *et al.*, 2014). However, both a decrease in some critical functions (cell growth and death or energy metabolism) and an increase in functions associated to multiple stress resistance (*e.g.* xenobiotic biodegradation and metabolism, signaling molecules and interactions, secondary metabolites metabolism) remarkably exhibited that bacterial communities in the most polluted sites developed specific

functions to face their environment. As the sites are not physically separated, there was no discontinuity in both communities and functions but a clear gradient of the relative components throughout the metal gradient. Metal contaminated environments were shown to exert a high selective pressure towards the transfer of several genes, developing thus resistance against high metal concentrations (Azarbad *et al.*, 2016). Only two field studies on long-term metal polluted areas have shown shifts in microbial community structure and functions or increased occurrence of resistance genes that have made microbial communities resistant to toxic metals concentrations (Hemme *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2013). However, both taxonomic affiliation of metal-specific metabolic traits and the currently available KEGG database are insufficient to validate the hypothesis that heavy metal stress is a key environmental factor shaping the function of microbial communities.

IV.2.5.2. Implication regarding others local selective pressures

Although trace metal gradient seemed to be the main driver of the bacterioplankton community features, other local selective pressures could explain a significant proportion of their variance. Indeed, bacterioplankton communities in coastal areas greatly vary in space because of sharp gradients in salinity, nutrients, depth, among other properties (Fuhrman *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2011).

A very similar trend could have been observed if DOM quantity or quality varied and became more labile in the most contaminated sites. Indeed, an increase in DOM lability often leads to the development of a copiotrophic response of the bacterial community, selecting a limited number of bacterial taxa and temporarily reducing microbial diversity (Nelson and Wear, 2014; Pedler *et al.*, 2014). The variation partitioning performed in our study is in agreement with this hypothesis, since DOC appeared as one of the most influent drivers of community structure variations. Thus, organic matter spatio-temporal dynamics could indeed be an important driver of microbial communities in Toulon Bay. However, according to the literature, only a part of the bacterial taxa significantly enriched in the most contaminated sites of Toulon Bay is known as copiotroph. Indeed, while OM60 (NOR5) clade (Halieaceae), *Candidatus Aquiluna* (Microbacteriaceae) and *Planktomarina* (Rhodobacterales) are known to benefit from labile DOM (Yan *et al.*, 2009; Spring *et al.*, 2015), Alphaproteobacteria members (SAR11 and AEGEAN-169 marine group) and Bacteroidetes (*Balneola* and *Aquibacter*) are

rather known as oligotrophic groups (Cram *et al.*, 2015; Sipler *et al.*, 2017). Copiotrophs are expected to outcompete oligotrophs, so the fact that presence of groups identified as copiotrophs suggest that each has capitalized on reduced competition following trace metal contamination. Taken together, all these arguments point out the major and predominant influence of the multicontamination gradient on microbial diversity and represent a significant demonstration of the potential influence of human activities on marine microbial life. Since we only considered inorganic contaminants, we cannot rule out the potential influence of organic contaminants such as PAH, PCBS or organometals which were already measured in the sediment of Toulon Bay (Misson *et al.*, 2016).

Organic contaminants as polyaromatic hydrocarbons could explained more precisely the distribution of OTUs (Qian *et al.*, 2017). This hypothesis could be confirmed by the strong enrichment in xenobiotics biodegradation and metabolism, carbohydrate metabolism and metabolism of terpenoids and polyketides in the highest contaminated sites. Naphthalene degradation, benzoate and aminobenzoate biodegradation were found to be higher in the most contaminated zones and is consistent with the finding of previous studies (Wang *et al.*, 2018).

Finally, another striking result is that the multicontamination gradient in the water column of Toulon Bay represented a significant perturbation, affecting microbial diversity all along our survey. This observation differs from what was observed previously in surface sediment of Toulon Bay (Misson *et al.*, 2016), suggesting that the contemporary contamination in the water affects more strongly microbial communities that the large historical contamination trapped in the sediment. Such difference could be linked to the probably higher dispersal rate in the water column than in the sediment, *i.e.* 3.4 days for a total renewal of the water of Toulon Bay (Dufresne *et al.*, 2014). Thus, this higher dispersal rate could tend to reduce the adaptive abilities of bacterioplankton, leading to a higher sensitivity to contamination when compared to the longer-term stability of the sediment.

IV.2.5.3. Biotic interactions as evidences of indirect effects of trace metals

The network indices (BC and CC) and large numbers of nodes (179) and edges (1664) between taxa in our network analysis suggest that SAR11, Rhodobacteraceae, Synechococcus, and Microbacteriaceae play a key role in Toulon Bay seawater. Despite some connections between

OTUs and trace metals, there were far more numerous connections among OTUs. This suggests that trace metals significantly influence the dynamics of only a few microbial groups, and could rather influence indirectly, via biotic interactions, the whole community in Toulon Bay seawater. Community structure is known to be influenced by interaction among species (Lima-mendez *et al.*, 2015). Some of these interactions could be cooperative interspecific interactions (Eiler *et al.*, 2011; Chow *et al.*, 2013) or competitive interactions (*i.e.* competition, niche partitioning, grazing or parasitism) (Fuhrman *et al.*, 2008; Berdjeb *et al.*, 2018) in a multispecies community.

Keystone OTUs play important roles in the regulation of network interactions (Wright *et al.*, 2012) and their loss may increase a community's vulnerability to perturbation. Thus, the strong decline of Alphaproteobacterial and Cyanobacterial keystone OTUs, especially, along the trace metal contamination gradient could have indirect effect on the BCC by modifying biotic interactions and favor opportunist or tolerant taxa (Lawes *et al.*, 2016). This is in agreement with community turnover and the development of copiotrophic groups highlighted above.

Additionally, in network analysis, positive correlation between on the one hand pico- and nanophytoplankton abundances, as well as chlorophyll *a,* and on the other hand trace metals concentrations describe potential conditions that may favor specific groups of bacterioplankton. Indeed, Fuhrman *et al.* (2015) explained that weekly timescale is appropriate for studying bacterial dynamics associated with phytoplankton, which have a direct influence on the composition of bacterial communities via cross-feeding interactions or the effect of toxins, as well as indirect influence (*e.g.* oxygen depletion). Phytoplankton succession may influence the dynamics of the bacterioplankton community, as differences in the phytoplankton structure lead to differences in quantity and quality of exuded organic matter that can be used by the bacterial community for growth (Goni-Urriza *et al.*, 2018). Consequently, effects of pollutants on phytoplankton or bacterioplankton might have indirect consequences for the counterpart, depending on the possible interactions between both compartments.

IV.2.6. Conclusion

In summary, Toulon Bay offered a remarkable study area allowing to address trace metal multicontamination impacts on prokaryotic community shaping throughout contrasted but connected sites. Where trace metal contamination increased, bacterioplankton abundance was higher together with a reduction of only community richness. Seawater contamination induced significant bacterioplankton communities shifts, with Alphaproteobacteria (SAR11, Rickettsiales, Rhizobiales and Rhodobacteraceae) and *Synechococcus* dominance where trace metal concentrations were the lowest, whereas Flavobacteria, Betaproteobacteria (Hydrogenophilaceae) and Gammaproteobacteria (Halieceae), especially including copiotrophic organisms, dominated in highly contaminated sites. In addition, this study showed that human-induced disturbances can have an effect on predicted functional potential of marine coastal bacterioplankton, and that the response can differ according to the type of functions. However, observed functional redundancy lead to think that the effect of trace metals could be complex, highly context-dependent and depending on biotic interactions. While our results provide a better understanding of anthropogenic influence on coastal ecosystems and the response of microbial communities, future studies are needed to elucidate the contribution of DOC, phytoplankton-bacteria specific interactions and organic pollutants on bacterioplankton communities in Toulon Bay.

Acknowledgements

This study was supported by PREVENT research program (funded by Toulon University, Toulon-Provence-Méditerranée (TPM) and the Conseil Départemental du Var). C. Coclet PhD was funded by the Provence-Alpes-Côte d'Azur region and supported by TPM. The authors wish to thank the French Navy and the LASEM for diving and sampling assistance, Dr. G. Culioli (MAPIEM, Toulon, France) and L. Favre (MAPIEM, Toulon, France) for sampling and sample treatment assistance. The authors declare that they have no conflict of interest.

IV.3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'impact de la contamination en ETM sur l'abondance et la structure des procaryotes hétérotrophes et autotrophes (bactéries et archées) dans la colonne d'eau dans la rade de Toulon par cytométrie en flux et par séquençage Illumina Miseq a été étudié. Pour ce faire, les concentrations en ETM ont été mesurées chaque semaine pendant 1 mois (Juin 2015) sur 5 sites le long du gradient de multicontamination en ETM.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de confirmer la présence du gradient de contamination multiple en ETM, avec très peu de variations des concentrations et de distribution des contaminants étudiés à l'échelle d'un mois. Comme déjà montré dans le chapitre précédent, l'abondance des procaryotes hétérotrophes était plus importante dans les zones fortement contaminées. La valeur ajoutée de cette étude par rapport aux deux précédentes a été l'analyse de la diversité phylogénétique de ces communautés. Ainsi, au contraire de l'abondance, la richesse taxonomique des communautés de procaryotes planctoniques était plus faible dans les zones contaminées. La contamination en ETM s'est aussi révélée être un facteur majeur structurant la composition et les fonctions des communautés présentes en surface et au fond de la colonne d'eau dans la rade de Toulon. La proportion de certains groupes taxonomiques, notamment affiliés à l'ordre des Alphaproteobacteria (SAR11, Rickettsiales, Rhizobiales, and Rhodobacteraceae) et à la famille des *Synechococcus* Family I été plus faible dans les zones contaminées que dans les zones peu contaminées. En revanche, la proportion de groupes affiliés à l'ordre des Flavobacteriia, des Betaproteobacteria et des Gammaproteobacteria étaient plus importante dans les zones où la contamination était maximale. Ces premiers résultats de diversité taxonomique ont montré un effet direct de la contamination en ETMs sur les communautés de bactérioplancton.

Toutefois, l'analyse en réseaux de co-occurrence a montré des relations fortes entre taxa mais aussi entre le bactérioplancton et l'ultraphytoplancton. Ce couplage entre ces deux compartiments a permis de mettre en évidence un effet indirect des ETMs sur le bactérioplancton. En effet, la toxicité des ETMs vis-à-vis du compartiment ultraphytoplanctonique a pu entrainer une libération de MOD et favoriser certains groupes de bactérioplancton. Ainsi, le développement de groupes pouvant être considérés comme des copiotrophes a été observé dans les zones contaminées de la rade de Toulon, plus compétitifs

que les groupes oligotrophes et, d'une certaine manière, et tirant de ce fait avantage de la contamination en ETM. Enfin, il est intéressant de noter ici que les archées étaient très peu représentées dans les échantillons d'eau, quel que soit le site. Durant toute l'analyse, les archées ont été considérées comme faisant partie de la fraction des OTUs rares (< 1% des séquences totales). Ainsi, il n'a pas été possible de conclure sur l'impact d'une contamination multiple en ETMs sur ce groupe.

Finalement, cette étude a aussi permis d'étudier l'impact d'une contamination multiple en ETMs sur la diversité fonctionnelle de communautés de bactérioplancton. La contamination a eu un impact négatif sur certaines fonctions, notamment liées aux mécanismes de défense contre une perturbation (*i.e.* dégradation des xénobiotiques). Cependant, un certain degré de résilience fonctionnelle dans les zones contaminées a pu être mis en évidence. Il est nécessaire de rester mesuré à la lumière de ces résultats car les outils de prédictions fonctionnelles restent très récents et les bases de données ne sont pas exhaustives, notamment en ce qui concerne les fonctions en lien avec une résistance aux ETMs.

Cette étude a tout de même permis de mettre en évidence un lien entre la multicontamination en ETM et l'abondance, la richesse, la composition et les fonctions des communautés de procaryotes planctoniques. Toutefois, la complexité du milieu naturel ne permet pas de conclure sur l'influence relative des ETMs par rapport aux autres conditions environnementales. Il apparait nécessaire d'approfondir les résultats obtenus à l'aide d'expérimentation en laboratoire. Le fonctionnement des organismes attachés à une surface (compartiment biofilm) semble aussi très différent du fonctionnement des communautés de la colonne d'eau, notamment en matière de réponse à un stress, de quelque nature que ce soit. De plus, les études de l'impact d'une contamination en ETM sur une communauté complexe de biofilm en milieu marin côtier naturel sont inexistantes. C'est dans cette optique que le chapitre V présentera l'analyse des communautés de procaryotes attachés à une surface immergée (biofilm) le long du gradient de multicontamination. Cette étude est basée sur la même campagne de terrain que celle décrite dans ce chapitre.

CHAPITRE V. INFLUENCE DE LA MULTICONTAMINATION EN ETM DE L'EAU SUR LA DENSITÉ ET LA DIVERSITÉ GÉNÈTIQUE DES COMMUNAUTÉS DE PROCARYOTES DANS LES BIOFILMS

V.1. Introduction du chapitre

Dans le chapitre précédent, les relations entre une multicontamination en ETM dans la rade de Toulon et l'abondance et la structure des communautés de procaryotes dans la colonne d'eau ont été présentés. Dans une problématique environnementale plus large, ce chapitre se focalisera sur les relations entre la contamination en ETM et les procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées) et autotrophes (cyanobactéries) dans des biofilms formés en surface et au fond de la colonne d'eau de la rade de Toulon. Les relations entre les communautés du compartiment planctonique et du compartiment biofilm dans ce contexte de forte contamination métallique ont été étudié. S'il a été plusieurs fois démontré que la composition des communautés microbiennes de ces deux compartiments était différente, la contribution des communautés environnantes à la colonisation d'un support et à l'établissement d'un biofilm, notamment en milieu marin côtier soumis à des perturbations importantes reste à ce jour très peu connue (Pollet *et al.*, 2018). De plus, les effets d'une contamination métallique sur des biofilms naturels complexes ont également très peu été étudiés. La production d'une matrice exopolymèrique et la structuration dans l'espace des biofilms induisent des mécanismes de résistance différents de ceux utilisés par les communautés planctoniques qui pourraient occasionner une différence de réponse au même gradient de contamination multiple.

Dans ce contexte, ce chapitre est basé sur la même étude de terrain d'un mois, en Juin 2015, que celle présentée dans le chapitre précédent. La densité et la structure des communautés de procaryotes associées à des plaques en polycarbonate (matériau plastique usuel) immergées en surface et au fond de la colonne d'eau, déterminées par qPCR et par la technique de séquençage haut débit Illumina Miseq sont présentés. Pour cette étude, les mêmes variables environnementales que dans le chapitre précédent ont été utilisées. Cependant, elles ont été mesurées différemment pour mieux appréhender les quantités

totales d'ETM auxquelles auront été exposés les biofilms pendant leur développement. Ainsi, les concentrations en ETM sont des valeurs labiles intégrées sur un mois par des capteurs passifs de type DGT. Les principaux objectifs de cette étude étaient : (i) d'étudier la variabilité spatiale de la densité et de la structure des communautés de procaryotes dans les biofilms le long du gradient de contamination, (ii) d'identifier les sources potentielles de procaryotes des communautés environnantes capables de coloniser les surfaces immergées et (iii) de mettre en évidence les facteurs environnementaux clés structurant les communautés de biofilm.

V.2. Evidence for microbial biofilm community structuring by sediment closeness rather than multichemical contamination or bacterioplankton composition

Cette partie est présentée sous la forme d'un article soumis et actuellement en révision dans la revue *Environmental Microbiology.* Les références sont toutes présentes dans la partie Références à la fin de ce manuscrit.

Clément Coclet[1,2], Cédric Garnier[2], Sébastien D'Onofrio[2], Gaël Durrieu[2], Emilie Pasero[3], Christophe Le Poupon[2], Dario Omanović[4], Jean-Ulrich Mullot[5], Benjamin Misson[2] and Jean-François Briand[1*]

[1] *Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM, EA 4323, Toulon, France,* [2] *Université de Toulon, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), UM110, France,* [3] *Microbia environnement Observatoire Océanologique, Avenue Pierre Fabre 66650 Banyuls sur mer France,* [4] *Ruđer Bošković Institute, Division for Marine and Environmental Research, Bijenička 54, Zagreb, Croatia,* [4] *LASEM-Toulon, Base Navale De Toulon, BP 61, 83800 Toulon, France*

[*]: corresponding author; email: briand@univ-tln.fr; tel: 33 4 94 14 67 60; *Université de Toulon, MAPIEM, EA 4323, Toulon, France*

Originality-Significance Statement

This is to our knowledge, the first spatio-temporal study of the marine microbial biofilm community structures in relation with anthropogenic gradients, sediment closeness, and bacterioplankton communities. Our results support the hypothesis that benthic communities play an essential role in microbial colonization, even in a strongly contaminated area. We also demonstrated the limited impact of strong metal contamination on biofilm communities indicated resistance or resilience capacities to multiple chemical stress. This has implication for the biofouling in the environment and their economic impacts.

V.2.1. Abstract

Anthropogenic pressure and specifically metallic pollutants may disrupt microbial ecosystems in coastal areas, including planktonic or biofilm communities. This study aimed at determining the poorly studied impacts of chemical pollutants on marine microbial biofilm community. We compared such influence to the contribution of planktonic microorganisms to the biofilm community composition combining taxonomic biomarker and network analysis. Inert PC plates were immersed for one month at five sites in Toulon Bay (North-Western Mediterranean Sea) along multi-elemental chemical gradients, at both the surface and bottom of the water column. Seawater was sampled weekly during one month for both chemical and Illumina sequencing of 16S rRNA gene amplicons. Biofilms were sampled after one month of immersion. The highly diversified biofilm demonstrated significant dissimilarities according to depth, whatever the site, with bottom biofilms enriched in genera reported as key members of sediments. This suggests that taxa from benthic communities may play an essential role in bottom surface colonization, even in a strongly contaminated area. Conversely to planktonic communities, the overall limited impact of chemical contamination on biofilm communities indicated resistance or resilience capacities to multiple chemical stress.

V.2.2. Introduction

Marine microbial biofilms are diversified microorganisms embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances that adhere to a substrate. Surface colonization by microbes in marine environment provide numerous advantages to these organisms including greater access to nutritional resources, enhanced organism interactions, and greater environmental stability (Costerton, 1995; Decho, 2000; McDougald *et al.*, 2011; Salta *et al.*, 2013; Dang and Lovell, 2016). Especially, biofilm constitutes a major bacterial lifestyle highlighting the ecological success of biofilms as habitat formers (Flemming *et al.*, 2016) However, biofilms also contribute to deleterious effects by reducing hydrodynamic performance and increasing fuel consumption when colonizing ship hulls (Schultz *et al.*, 2011) or promoting the corrosion of metallic structures like off-shore platforms or marine renewable facilities (Païssé *et al.*, 2013; Kip and Veen, 2015; Macleod *et al.*, 2016). They are also actors of plastic colonization and potentially degradation as key members of the plastisphere, which becomes a prominent marine environmental issue (Zettler *et al.*, 2013; Debroas *et al.*, 2017; Dussud *et al.*, 2018; Oberbeckmann *et al.*, 2018). In this context, improving our knowledge about microbial biofilm community structure, ecology and functioning in coastal ecosystems could lead to a better understanding of the response and adaptation of related microorganisms to environmental stresses, thus contributing to manage more efficiently ecological risk and economic hazards.

As transitional zones between terrestrial, riverine, and marine ecosystems, coastal ecosystems present naturally strong spatial heterogeneity in physico-chemical conditions. Bacterial communities of natural biofilms were reported to be directly driven by their ecosystem features such as salinity, temperature (Lau *et al.*, 2005), tidal level (Qian *et al.*, 2003), dissolved oxygen (Nocker *et al.*, 2007), nutrients (Lawes *et al.*, 2016) or substrata (Chiu *et al.*, 2007). Natural biofilms formed under different environmental conditions could vary in their density, morphology, as well as diversity and phylogenetic structure (Ghiglione *et al.*, 2009; Oberbeckmann *et al.*, 2018). In addition, due to significant urban and industrial development in coastal areas, these ecosystems are exposed to a diversity of anthropogenic disturbances acting as local potentially selective pressures (Halpern *et al.*, 2008). Chemical contamination, and especially trace metal contamination has now been demonstrated to occur frequently in anthropized coastal areas (Boyd *et al.*, 2005; The Mermex Group *et al.*,

2011; Lafabrie *et al.*, 2013). Because microbial biofilm communities were shown to be influenced by some local environmental conditions (Lee *et al.*, 2014; Briand *et al.*, 2017), they could also be significantly affected by chemical contaminants encountered in coastal seawater and sediment. This could explain why contaminated areas often present divergent biofilm community composition, compared to uncontaminated areas (Webster and Negri, 2006; Briand *et al.*, 2012; McElroy *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2018). Among chemical contaminants, multiple trace metallic contaminations have been demonstrated to contribute in shaping microbial community's structure inhabiting several environments including freshwater (Aguinaga *et al.*, 2018), seawater (Webster and Negri, 2006; Sheeba *et al.*, 2017; Coclet *et al.*, 2019), freshwater sediment (Gough and Stahl, 2011; Ni *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2019) and marine sediment (Quero *et al.*, 2015; Misson *et al.*, 2016). However, relationships between natural and complex marine biofilm on one hand, and trace metal contamination on the other hand, remains to be determined.

Key microbial interactions as cooperation and competition or mechanisms including intraspecies and interspecies communication have also been identified as critical for the microbial biofilm community (Dang and Lovell, 2016). In addition to interspecies relationships inside the biofilm, microbial communities in other surrounding compartments like seawater or sediment can greatly influence the formation and the development of natural marine biofilm. Several studies on stainless steel, polycarbonate, and glass surfaces indicate that artificial surfaces are colonized by a subset of the total diversity of microorganisms inhabiting the surrounding seawater (Dang and Lovell, 2002a, 2002b; Jones *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). While bacterioplanktonic and biofilm communities are regularly reported to be dissimilar, the actual relative role of planktonic and benthic communities on biofilm formation remains largely unknown. Since planktonic and benthic communities respond rapidly to changing environmental conditions (Dussud *et al.*, 2018; Oberbeckmann *et al.*, 2018), we hypothesized that spatial heterogeneity of surrounding microbial communities serving as inoculum for biofilms along a chemical contamination gradient could lead to a similar spatial trend in biofilm community composition.

In this study, we used 16S rRNA gene sequencing to investigate the prokaryotic biofilm communities formed on inert PC plates and collected from five sites at the surface and bottom of the seawater column, along the chemical contamination gradient in the Toulon Bay (NW Mediterranean Sea). Our aims were to (i) characterize patterns of biofilm microbial

communities along the water column and across environmental gradients in the bay, (ii) identify potential sources of prokaryotic surface colonizers in the surrounding communities, and (iii) identify key environmental drivers and understand how they link to microbial biofilm community structure.

V.2.3. Experimental Procedures

V.2.3.1. Immersion sites, experimental design and sample collection

The five immersion sites (*i.e.* 41p, Pt15, Pt12, MIS and 6ext) were located throughout the semi-enclosed Toulon Bay (North-Western Mediterranean Sea, France), from the entrance of the bay to the north-western anthropized area (Figure V-1). A description of sample's characteristics can be found in Table D- 1.

Polycarbonate was chosen as a common plastic substrate found in seawater. PC plates were previously sandblasted to promote microbial adhesion. All plates have been immersed in the five sites at the surface (1m depth) and the bottom (1m above sediment) of the water column, over a period of one month, from June 1st to June 29th, 2015. At the end of immersion (28 days), PC plate biofilm samples were collected and washed with sterile artificial seawater. Biofilm samples were collected by scraping individually three plates of 25 cm^2 at every site (n = 30), placed upright in sterile cryotubes, and stored frozen at -80°C for later analysis (Briand *et al.*, 2017). Additionally, seawater samples (1L) were collected from each immersion site, at both surface and bottom of water column, every week over the one-month experiment (n = 50), as described in Coclet *et al.* (2019).

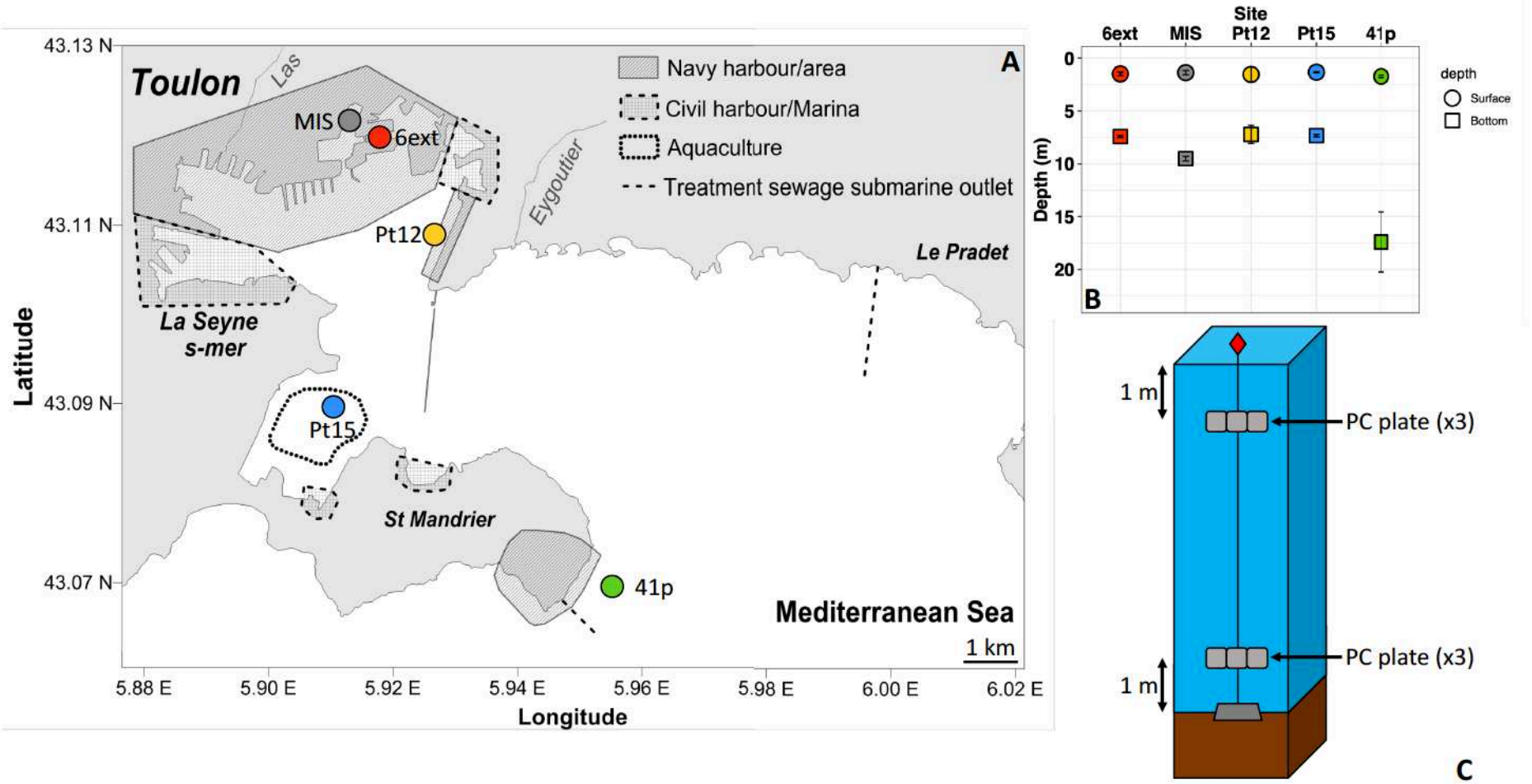


Figure V-1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites (A). Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively. Bottom and surface depths of sampling in each site (B) and immersion design at each site (C).

V.2.3.2. Environmental measurements

For each sampling site and depth, water temperature (°C), salinity, dissolved oxygen (mg.L^{-1} and %) and chlorophyll a (µg.L^{-1}) were measured on site using multi-parameter probe (Hydrolab DS5, OTT). Nutrients (DOC, NO_3^-, PO_4^{3-}) and dissolved trace metal were also analyzed as detailed in Coclet *et al.* (2018, 2019). Additionally, labile trace metals concentrations, considered to be more representative from the bioavailable fraction (Caillat *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016), were assessed at every sampling site and depth using three passive samplers (diffusive gradients in thin-films – DGT) immersed for the whole survey (n = 30). DGT devices, sample preparation and analytical methods for multi-element analysis in DGT eluates were described in Cindrić *et al.* (2017) and are summarized in ANNEXE D.

V.2.3.3. DNA extraction, 16S rRNA gene amplicon sequencing and quantification

Biofilm materials were extracted using the PowerBiofilm® DNA isolation Kit (Qiagen) following the supplier's instructions.

The 16S rRNA gene V4-V5 region was amplified with primers 515F-Y/926R (Parada *et al.*, 2016). The PCR reaction (50 µL) contained 25 µL of 2X GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega), 1 µM of each primer 515F-Y/926R, and approximately 2 ng of DNA. The following thermal cycling scheme was used: initial denaturation at 95°C for 5 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, annealing at 50°C for 1min, followed by extension at 72°C for 1 min. The final extension was carried out at 72°C for 10 min. PCR products were checked on a 1.5% agarose gel. No amplification was yielded for negative controls consisting in the reaction mixture with MilliQ water as template. Amplicons were then paired-end sequenced (2 x 250 bp) with an Illumina MiSeq sequencer by the GeT-PLaGe plateform (Castanet-Tolosan, FRANCE).

Quantification of 16S rRNA gene was performed by qPCR using primers BAC338f/515R (Borrel *et al.*, 2012). Amplification reactions were performed in triplicate in a LightCycler 480 thermocycler (Qiagen) with GoTaq® SybrGreen mastermix (Promega) in a final volume of 10 µl containing 0.25 µM of each primer and 2 ng of DNA. Serial 10-fold dilutions of a linearized recombinant plasmid ranging from 107 to 102 copies were also amplified in duplicate in each

qPCR run to produce a standard curve used for determining 16rRNA gene copy number in the samples.

V.2.3.4. Bioinformatic analysis

Forward and reverse reads were merged using PEAR 0.9.8 with default options (J. Zhang *et al.*, 2014). Raw sequences were analyzed using MacQiime v.1.9.1 software (Caporaso *et al.*, 2010). Briefly, barcode, primer, shorter sequences (<100 bp in length) and sequences with ambiguous base calls or homopolymer runs exceeding 10 bp were removed. The remaining sequences were assigned to operational taxonomic units (OTUs) and clustered at a 97% threshold using Uclust algorithm (Edgar, 2010), both closed and open reference OTU picking, based on the SILVA (release 128) database (Pruesse *et al.*, 2007; Quast *et al.*, 2013). Low abundance OTU (<0.005%) were filtered as recommended by Bokulich *et al.* (2013). Sequences classified as mitochondria or chloroplast were removed from the OTU table, corresponding to 610 OTUs. A total of 233 120 reads were finally obtained representing 12 877 OTUs. OTU table was normalized by random subsampling to the smallest number of sequences (*i.e.* 5828). The 16S rRNA gene sequences have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database under BioProject ID PRJNA522389.

V.2.3.5. Data analysis

All data analysis and plots were done in R Studio using the core distribution (R Core Team, 2017). Details on data analysis is given in ANNEXE D. Briefly, the alpha diversity was calculated in Qiime using Chao1, equitability, Observed OTUs, PD whole, Shannon and Simpson indices (Caporaso *et al.*, 2010). One-way and two-way ANOVA tests and post-hoc comparisons were used to assess differences between lifestyle, sampling sites and depths for labile metal concentrations, alpha diversity indices and prokaryote densities. Principal component analysis (PCA) was employed to observe difference in environmental profile between both sampling sites and depths, using FactoMineR package (Lê *et al.*, 2008). Only environmental variables with significant difference ($p < 0.01$) were fitted on the PCA plot using envfit function (vegan package) (Oksanen *et al.*, 2016). Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) ordination and Hierarchical clustering analysis based on Bray-Curtis dissimilarity matrices, using the vegan

package, was used to visualize taxonomic community profiles. Permutational multiple analysis of variance (PERMANOVA) tests were used to identify significant differences in bacterial community structure between lifestyle, sampling sites, and depths. To investigate the relationships between biofilm community and environmental variables, redundancy analysis (RDA) was performed on the global community using the vegan package in R as already described (Coclet *et al.*, 2018, 2019). A linear discriminant analysis (LDA) effect size analysis (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011) was used to determine significantly differentially distributed OTUs between depths or sites. Correlation networks were generated by CoNeT (Cooccurrence Network) plugin 1.1.1.beta (Faust and Raes, 2016). The networks were filtered by correlation magnitudes < -0.8 and > 0.8. The networks were visualized by Cytoscape 3.4.0 (Shannon *et al.*, 2003). Keystone OTUs were selected using betweenness centrality (BC) > 0.02 and closeness centrality (CC) > 0.3. Heatmaps were used to visualize the Spearman correlations between biofilm keystone OTUs and environmental variables generated using ComplexHeatmap package (Gu *et al.*, 2016).

V.2.4. Results

V.2.4.1. Physical and chemical environmental characterization of Toulon Bay seawater

Thirty-three physicochemical environmental variables were ordinated in a PCA (Figure V-2) and all raw values are presented in Table D- 2 and Table D- 3. In the PCA, the first two principal components explained 64.4% of the variability in the data set and 17 environmental variables were significantly discriminants (envfit, $p < 0.01$). PC 1 was mainly influenced on the one hand by trace metal contaminants (*e.g.* dissolved and labile Cu, Cd, Pb and Zn), which were negatively correlated with PCA 1, and on the other hand by oceanic tracers (Rb and Sr), which showed a positive correlation with this PC. A significant increase in both discrete dissolved and integrated DGT-labile Cd, Cu, Pb and Zn concentrations was observed from the uncontaminated site (41p) to enclosed sites (MIS and 6ext) in the most anthropized area (ANOVA; $p < 0.05$) (Table D- 2). PC 2 was negatively correlated with dissolved and labile Cu and positively correlated with Pb, especially. Surface of contaminated sites was characterized by elevated dissolved and labile Cu concentrations while bottom water was characterized by elevated dissolved and labile Pb concentrations. Dissolved and labile metal concentrations

were strongly positively correlated. Thus, among the 17 significant environmental variables only labile metal concentrations (Cd, Cu, Pb, and Zn) and the other significant variables (Dissolved Ba, Be, Cr, Mn, Rb, Sb, Sr, Salinity, and TN) were used in the following analyses.

V.2.4.2. Alpha diversity of prokaryotic fractions

Richness and diversity indices all showed the same trend with significantly higher values in biofilm compared to seawater (Figure D- 1) (ANOVA; $p < 0.05$). In biofilm samples, both richness and diversity indices were significantly higher for bottom samples compared to surface ones (ANOVA; $p < 0.05$) except for the richness and PD_Whole at the most enclosed site (6ext) (Figure D- 2). Additionally, except Simpson index, diversity and richness indices differed significantly between sites (ANOVA, $p < 0.05$) (Figure D- 2). Based on these indices, lowest richness and diversity was found in MIS site while sites Pt15 and 6ext displayed the highest diversity.

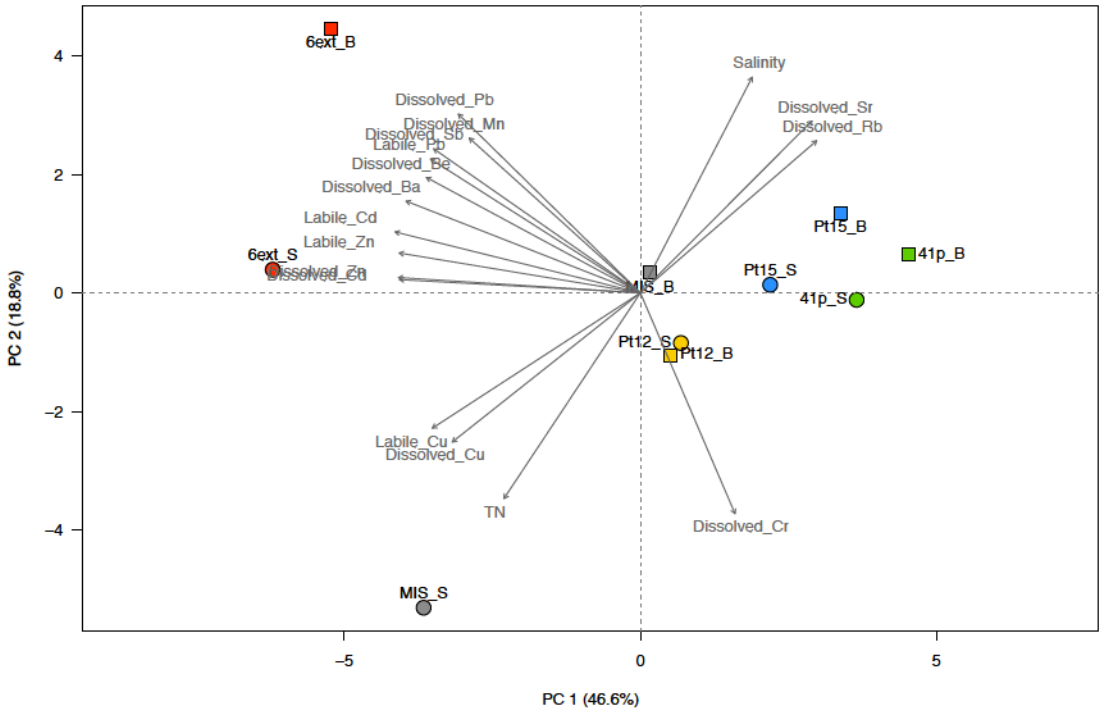


Figure V-2 Principal component analysis biplot of the environmental variables of surface and bottom seawater collected at the 5 different sites. Color of symbols depend on site sampling.

V.2.4.3. Biofilm versus planktonic prokaryotic communities

Although the bacterial phyla Proteobacteria, representing 58% and 49% of total reads, and Bacteroidetes, representing 27% and 31%, were numerically dominant in both planktonic and biofilm communities, respectively, substantial differences in community composition between lifestyles were observed at the phylum level and below (Figure V-3). UPGMA clustering showed that seawater (clusters I and II) and biofilm (clusters III to VII) communities were clearly distinct, showing only 25% of similarity (Bray-Curtis index) (Figure V-3). PERMANOVA tests (Table D- 4) confirmed that differences between "lifestyles" were significant and even greater than the taxonomic rank is low (PERMANOVA, R2 = 0.40 to 0.65, $p < 0.001$). Seawater samples (clusters I and II) were dominated by Flavobacteriaceae (20 ± 1.6%), SAR11 Surface 1 clade (15 ± 2.3%), Rhodobacteraceae (15 ± 1.3%), Synechococcus (8.1 ± 0.45%), SAR116 clade (7.3 ± 0.78%) and Halieaceae (7.0 ± 0.79%). Biofilm samples (*i.e.* clusters III to VII) were dominated by Rhodobacteraceae (19 ± 0.68%), Flavobacteriaceae (15 ± 1.1%), Saprospiraceae (7.7 ± 0.80%), Planctomycetaceae (5.4 ± 0.62%), Flammeovirgaceae (3.2 ± 0.17%) and Hyphomonadaceae (3.2 ± 0.33%).

Archaea had low relative abundances in both seawater and biofilm samples (less than 0.06% of total sequences). Thus, Archaea have been considered as "others" in the following analysis, which was the rare fraction.

The distinctness of bacterial communities was also reflected in the number of shared OTUs across the two lifestyles (Figure D- 3). Biofilm had the largest number of unique OTUs (only observed in this compartment) (n = 11099; 86%), but these were mostly rare OTUs. Seawater had the lowest number of unique OTUs (n = 833; 6.5%). We found 945 OTUs (7.3%) shared between the biofilm and seawater samples, which was defined as the "core community".

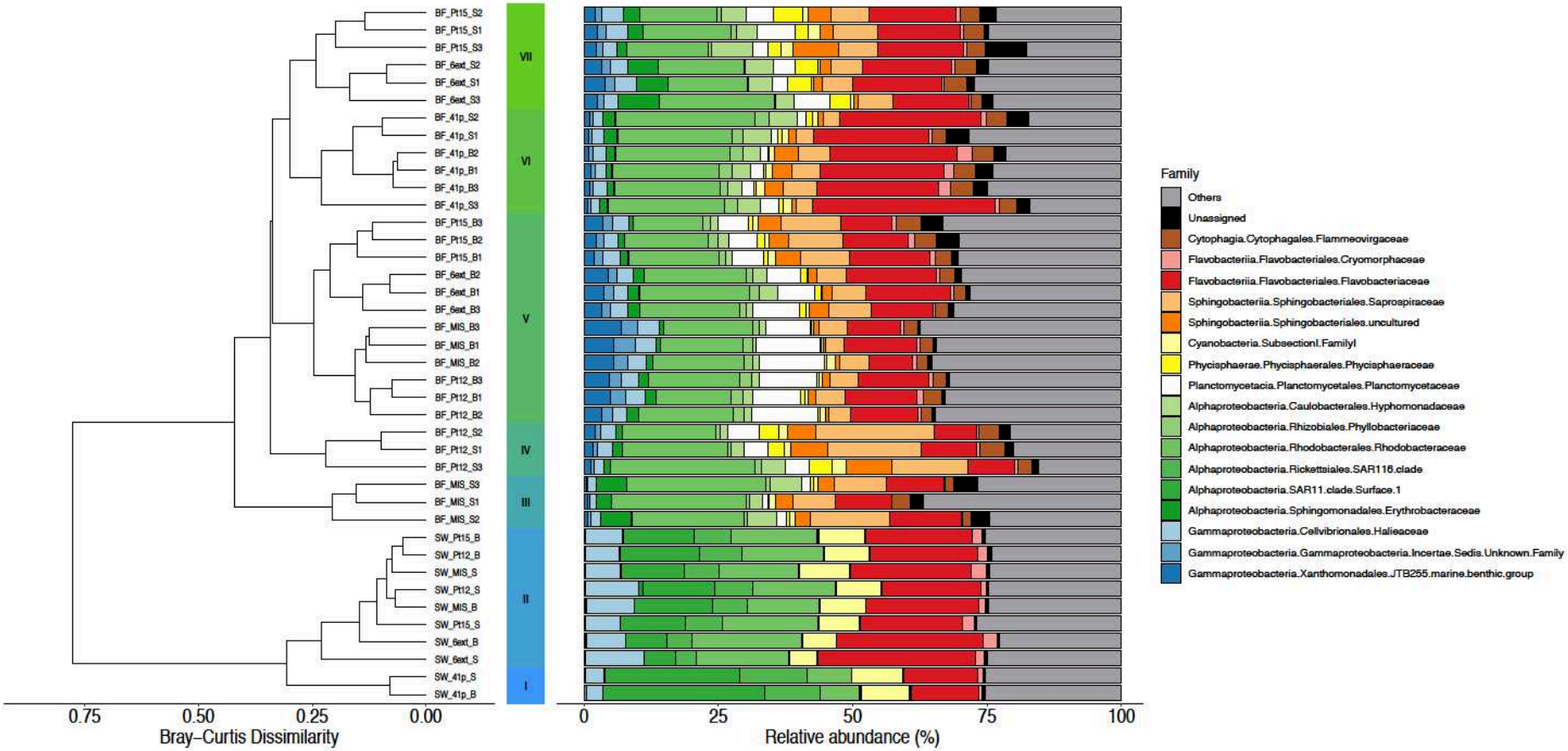


Figure V-3 Composition of heterotrophic microbial community at the family level in seawater (SW) and biofilm (BF) at surface (S) and bottom (B) samples at the 5 different sites of Toulon Bay. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. The dendrogram was conducted from the OTU abundance table using Bray-Curtis dissimilarity. The scale bar of the dendrogram represents the dissimilarity level (%) between heterotrophic community.

Two separate co-occurrence networks were constructed to examine potential associations between bacterioplankton and surface-attached bacteria in both surface and bottom samples (Figure V-4). In both surface and bottom networks, 72% and 80% of potential associations were negative, with taxa observed mainly in biofilm being poorly associated with taxa mainly observed in seawater, and very few taxa observed in both lifestyles abundantly. An overview of associations revealed that keystone OTUs SAR116 clade, SAR11 clade, NS5 marine group for seawater and Tenacibaculum, uncultured OM190, BD1-7 clade for biofilm showed the highest number of negative associations.

V.2.4.4. Differences in biofilm communities between surface and bottom seawater of Toulon Bay

Prokaryote densities, estimated by qPCR, ranged between 5.4 x 10^4 and 2.5 x 10^7 16S rRNA gene copies.cm^{-2} after one month of immersion (Figure D- 4). An ANOVA test confirmed no significant difference between surface and bottom densities (ANOVA; $p > 0.05$). Hierarchical clustering revealed primary depth structuration of biofilm communities. Samples were grouped into five distinct clusters, the cluster V bringing together nearly all the bottom communities except those at the opening of the bay on the open sea (site 41p) (PERMANOVA, $p < 0.001$) (Figure V-3; Figure D- 5 and Table D- 4). While Rhodobacteraceae (17-20%) and Flavobacteriaceae (15-16%) were the most abundant families at both depths, the surface biofilms were also characterized by high proportions of Saprospiraceae (9.0 ± 1.4%) and Hyphomonadaceae (4.4 ± 0.40%) whereas bottom biofilms were rather characterized by Planctomycetaceae (7.3 ± 0.94%) and Saprospiraceae (6.4 ± 0.57%). Going beyond these dominant families, a total of 13 taxonomic indicators were identified when comparing surface and bottom biofilm communities (Tableau V-1). At the family level, NS11-12 marine group (Sphingobacteriia) and Uncultured E01 9C-26 (Gammaproteobacteria) were discriminant of the bottom biofilm as well as the orders Bacteroidia Incertae Sedis, Uncultured Planctomycetes and Arenicellales and the phylum Actinobacteria. OTUs assigned to the genera Fluviicola (Flavobacteriia), Tropicimonas (Alphaproteobacteria), Desulforhopalus (Detltaproteobacteria) and Persicirhabdus (Verrucomicrobiae) were significantly discriminant of the bottom biofilm communities. No taxon was significantly discriminant of the surface biofilm communities.

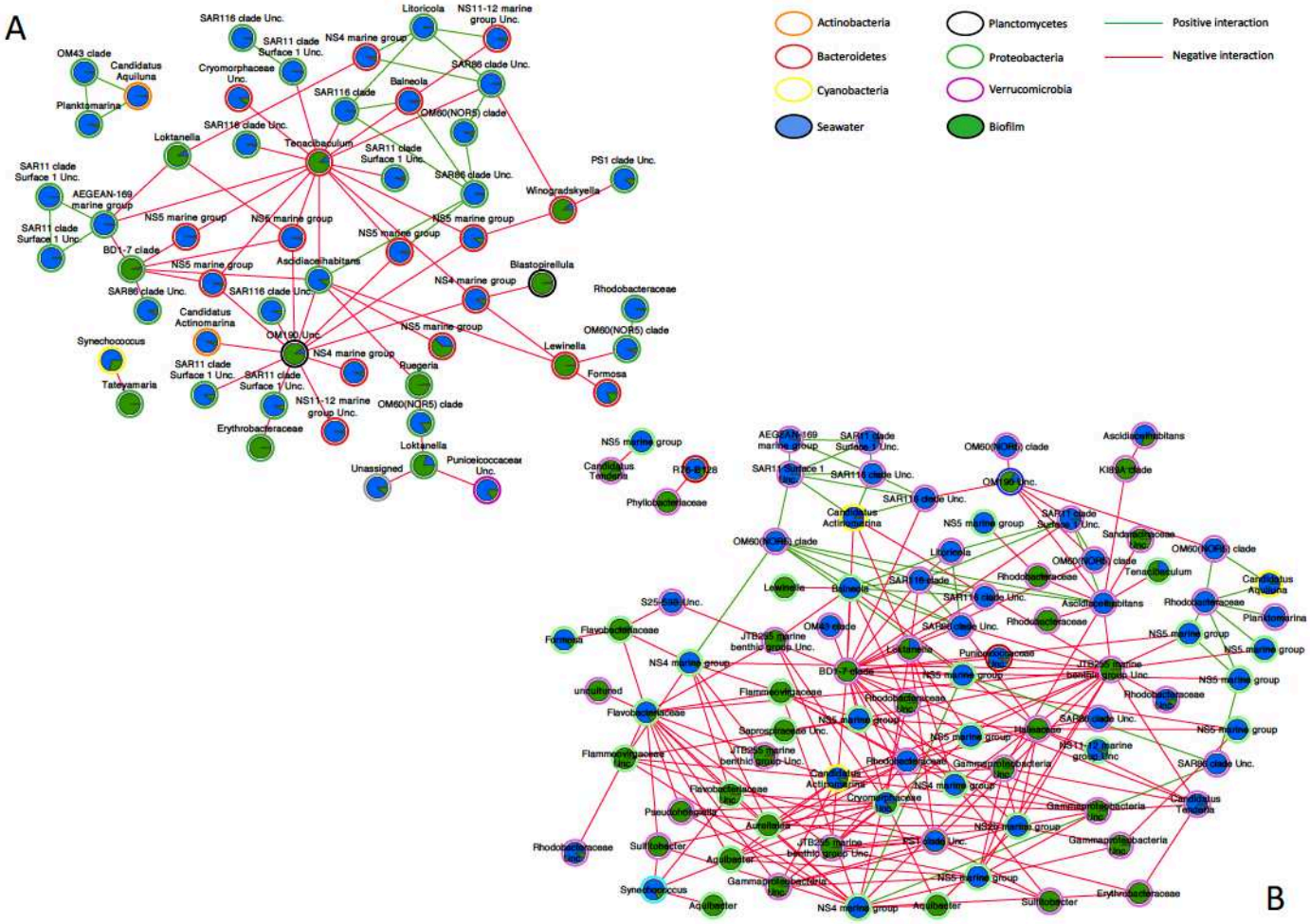


Figure V-4 Co-occurrence sub-networks using CONET analysis of bacterial taxa derived from the OTU table in surface (A) and bottom (B) samples and showing only statistically significant correlations. Nodes colors correspond to main bacterioplankton classes. Pie chart plots into nodes indicate OTU distribution between SW and BF samples. Green and red lines represent positive and negative correlations, respectively.

Tableau V-1 Results of linear discriminant analysis test to identify differentially abundant OTUs for sampling depth comparisons using LEfSe (Log LDA score > 2; p < 0.05).

Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	LDA score	P
Bacteria	Actinobacteria*	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Sva0996 marine group	Other	2,77	< 0,001
Bacteria	Actinobacteria*	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Sva0996 marine group	Unc. actinobacterium	2,02	< 0,001
Bacteria	Actinobacteria*	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Sva0996 marine group	Unc. Bact.	3,23	< 0,001
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Incertae Sedis*	Draconibacteriaceae	Draconibacterium	1,86	< 0,001
Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Fluviicola*	2,58	< 0,001
Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	NS11_12 marine group*	Unc. Bact.	2,50	< 0,001
Bacteria	Planctomycetes	OM190	Unc. Planctomycete*	Unc. planctomycete	Unc. planctomycete	2,42	< 0,001
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales*	OCS116 clade	Unc. Bact.	2,25	< 0,001
Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Tropicimonas*	2,29	< 0,001
Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobulbaceae	Desulforhopalus*	2,10	< 0,001
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Arenicellales*	Arenicellaceae	Arenicella	2,83	< 0,001
Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	E01_9C_26 marine group	Unc. Bact*.	Unc. Bact.	2,49	< 0,001
Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	Persicirhabdus*	2,08	< 0,001

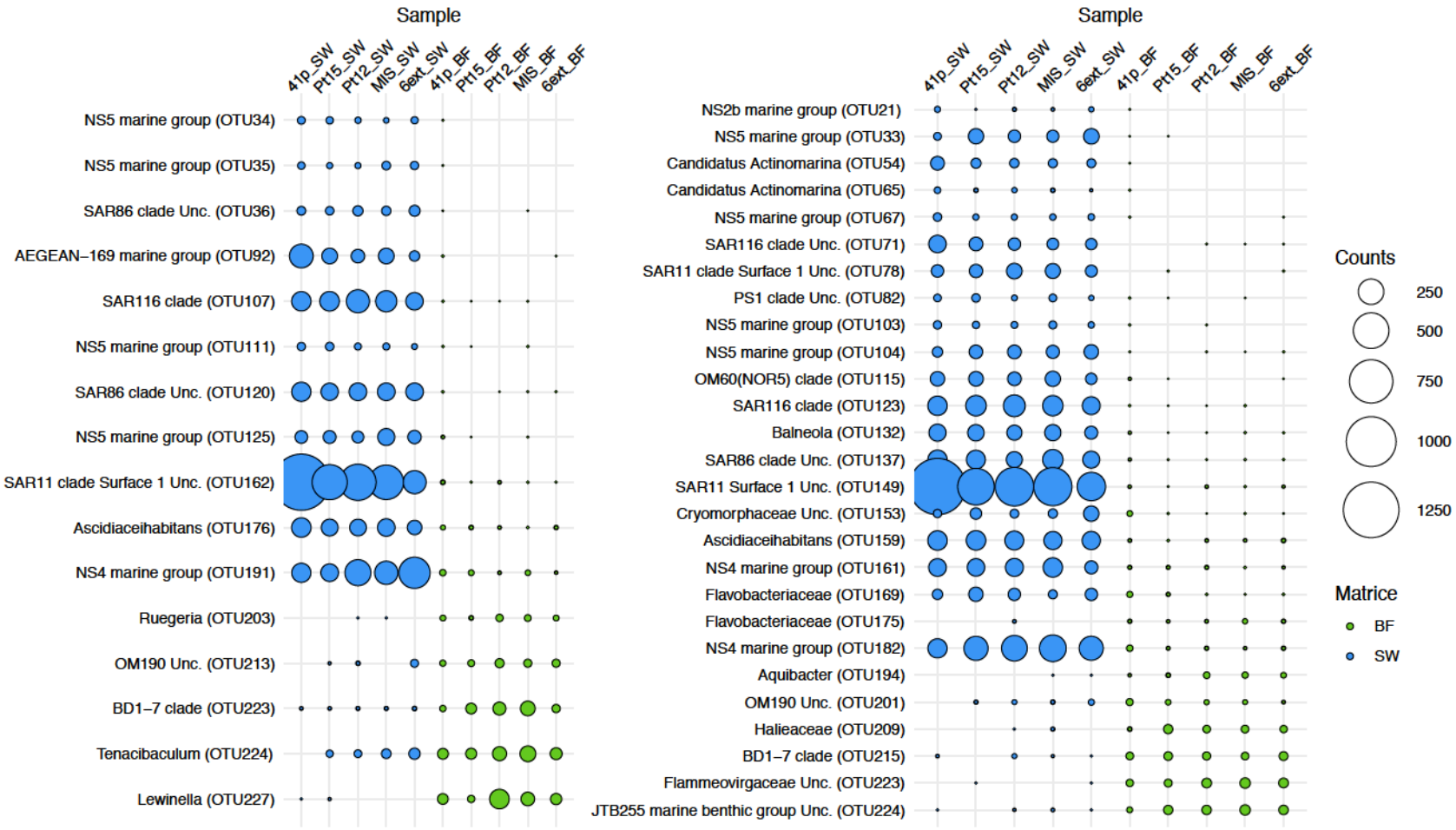


Figure V-5 Bubble plots showing the keystone OTUs from surface (A) and bottom (B) samples, each displaying a relative abundance in SW (blue) and biofilm (green) samples.

The network topologies for surface or bottom samples showed different patterns. Overall, at the surface, OTUs (53 nodes) and species association (72 edges) were less numerous than at the bottom (87 nodes and 211 edges). Additionally, more keystone OTUs were highlighted in the bottom (27) than in the surface (16) network (Figure V-5). Keystone OTUs affiliated to the genera OM190 and BD1-7 were found in surface and bottom biofilm. Keystone OTUs affiliated to the genera Ruegeria, Tenacibaculum and Lewinella were central in surface network (Figure V-5A) while keystone OTUs affiliated to the families Flavobacteriaceae, Aquibacter, Halieaceae, Flammeovirgaceae and JTB255 marine benthic group (MBG) were central in bottom network (Figure V-5B).

V.2.4.5. Differences in biofilm communities between sampling sites of Toulon Bay

Densities significantly differed between sites (ANOVA, $p < 0.001$). The highest and lowest densities were observed in the site Pt15 (1.2 ± 0.2 x 107 cell.mL^{-1}) and site MIS (1.6 ± 0.3 x 106 cell.mL^{-1}), respectively (Figure D- 4).

In addition to the depth structuration of biofilm communities, the hierarchical analysis revealed that community composition differed significantly between sites (PERMANOVA, $p < 0.001$) (Table D- 4). In order to identify a significant differential distribution of bacterial groups at the OTU level in relation to site of immersion, LEfSe analyses were applied. For this test, we considered each site separately as identified by the hierarchical analysis and confirmed by ANOSIM. A total of 33 taxonomic indicators were found to be differentially abundant in the 5 sites in surface. Sites 41p and 6ext exhibited the highest number of taxonomic indicators (10 for both sites). OTUs assigned to the genera Croceitala, Polaribacter, Tenacibaculum and Winogradskyella (Flavobacteriaceae), Pseudahrensia, Ascidiaceihabitans (Alphaproteobacteria) and to the families Rhodospirillaceae and Pseudoalteromonadaceae were significantly discriminant of site 41p, the less contaminated site (Table D- 5). OTUs affiliated to Proteobacteria (5 Alphaproteobacteria and 2 Gammaproteobacteria), especially Parvularcula, Tateyamaria, Erythrobacter, Parasphingopyxis and JTB255 MBG, were significantly discriminative of site 6ext, the most contaminated site (Table D- 5).

At the bottom, four sites (*i.e.* 41p, Pt12, MIS, and 6ext) were very significantly distinct, with numerous specific OTUs (Table D- 6). Among OTUs that discriminated 41p from other sites were seven genera assigned to Bacteroidetes, two assigned to Alphaproteobacteria and

one to Verrucomicrobia. Four members of the Gammaproteobacteria class, especially OM60 (NOR5) clade and JTB255 MBG were identified as discriminant OTUs of MIS site. Finally, four members of Alphaproteobacteria class significantly discriminated the 6ext site.

V.2.4.6. Relationships between biofilm communities and environmental variables

In this study, the relative contribution of the significant environmental variables selected by the PCA analysis in the variations of biofilm community composition was tested by RDA. Surface and bottom samples formed two separate clusters, however RDA analysis found that the set environmental variables we measured didn't contribute significantly to the variation in the overall biofilm community structure (ANOVA.CCA, $p > 0.05$).

Additionally, keystone OTUs from both surface and bottom biofilms exhibited different relative abundances between sampling sites but they didn't seem to follow a clear trend along the chemical contamination gradients (Figure V-5) observed in Toulon Bay (Figure V-1). However, among the significant variables defined by PCA, labile Cu was strongly positively correlated to both surface and bottom biofilm keystone OTUs (Figure V-6). Additionally, in the surface biofilms, keystone OTUs seemed to be strongly positively correlated to labile Cd and dissolved Mn. In the bottom biofilms, keystone OTUs also seemed to be strongly to labile Pb and Zn and dissolved Be, Ba and Sb.

V.2.5. Discussion

The variations of coastal microbial communities along environmental gradients have been largely described (Lozupone and Knight, 2007; Fuhrman *et al.*, 2008; Fortunato *et al.*, 2011). In this study, we investigated the prokaryotic community in Toulon Bay using a more comprehensive approach that included both planktonic and biofilm lifestyles in surface vs bottom waters. We particularly explored the key environmental drivers shaping the community structure within an anthropogenically impacted coastal area.

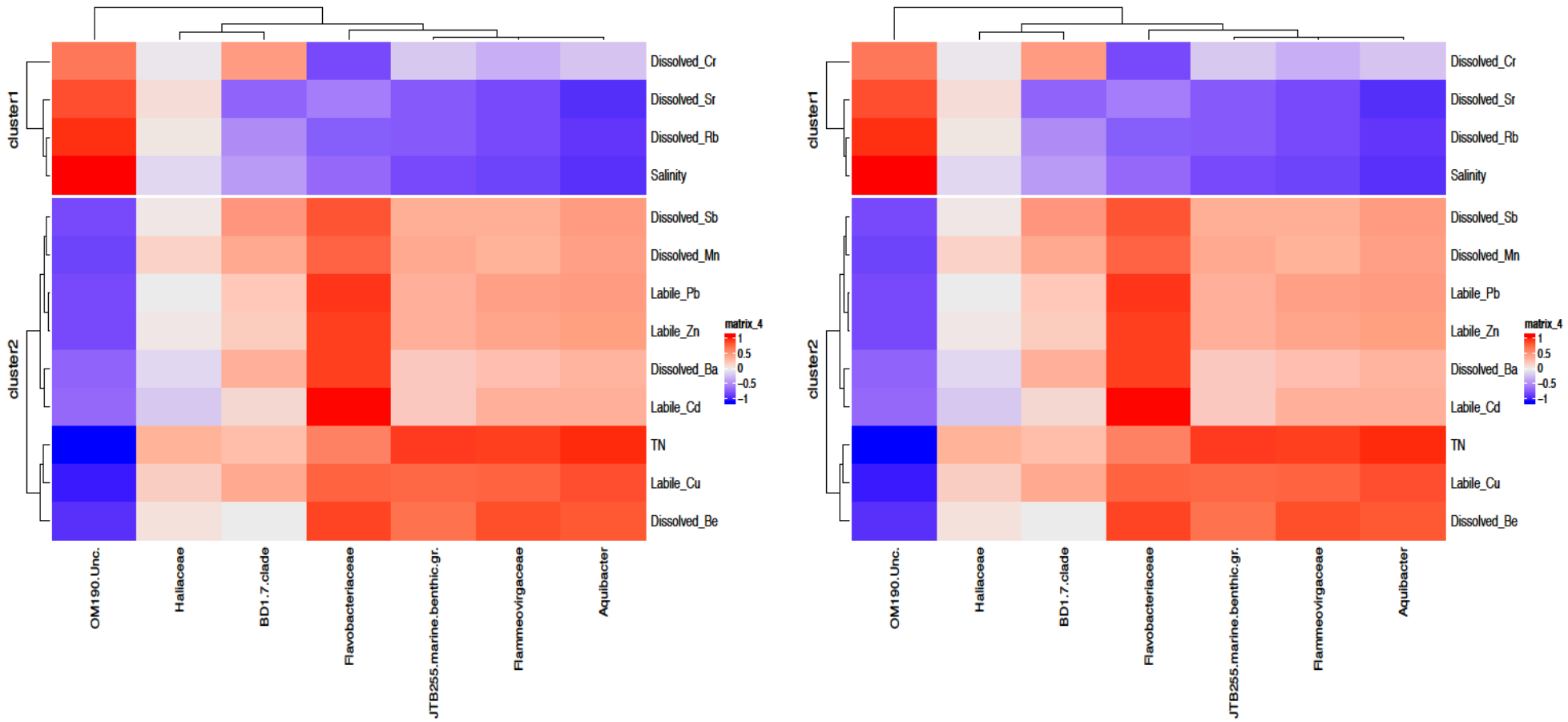


Figure V-6 Heatmaps showing Spearman correlations between surface (A) and bottom (B) biofilm keystone OTUs and the most discriminant environmental variables selected from PC analysis. The color intensity for each panel corresponds to spearman correlation, red indicates high levels of correlation while blue indicates low levels of correlation.

V.2.5.1. Biofilm communities are dissimilar to planktonic communities

The first goal of this study was to improve our understanding on the prokaryotic community distinction and relationships between two lifestyles (*i.e.* planktonic and biofilm) in the highly contaminated Toulon Bay. Although SW and BF communities possessed common taxonomic groups considering the overall community structure, differences of structure between both lifestyles were observed from phylum to species taxonomic ranks and this separation of community structure was higher at the lowest taxonomic rank (Table D- 4). Additionally, alpha diversity showed a clear distinction between lifestyles with unintuitive higher diversity in biofilms (Figure D- 1). The rarefaction curves reached a plateau, indicating that sufficient sequence depth was reached to capture the overall diversity in the samples (data not shown). Thus, the higher diversity in BF samples could be explained by a greater flux of microorganisms induced by hydrodynamic circulation in SW samples than in BF which is an integrative system where microorganisms have settled onto surfaces during the entire time of immersion (Amaral-Zettler *et al.*, 2015). Thereby, microbial communities colonizing immersed PC plates were markedly different from the microbial communities of SW, both at the surface and bottom of the seawater column, and irrespectively from the sampling site. These findings support several previous studies pointing toward a consensus that bacterioplankton community structure differs from immersed artificial surface attached ones (Zettler *et al.*, 2013; Oberbeckmann *et al.*, 2014; Amaral-Zettler *et al.*, 2015; De Tender *et al.*, 2015; Oberbeckmann *et al.*, 2016; Bryant *et al.*, 2016; De Tender, Devriese, *et al.*, 2017; Kirstein *et al.*, 2018). Plastic, whatever its nature (Kirstein *et al.*, 2018), provides a novel habitat for microorganisms and that species sorting occurs, particularly, during the early colonization stages (Harrison *et al.*, 2007; W. P. Zhang *et al.*, 2014; Bryant *et al.*, 2016; Ogonowski *et al.*, 2018). Pioneer stages were restricted to specialists displaying adhesion capacity and/or exopolymeric secretion potential and probably communication ability (McDougald *et al.*, 2011; Flemming *et al.*, 2016). The increase in diversity over time, leading to highly diversified biofilms as reported here, was associated to the recruitment of generalists probably supplementing the initial community in terms of functions. Our results, according to analyses of artificial surface supported biofilms, suggest that the composition of marine microbial biofilms is generally distinct from the surrounding seawater. These differences could be

strongly linked to early recruitment of specialist microorganisms and to an increase of diversity due to the recruitment of generalists.

In recent studies, De Tender, Devriese, *et al.* (2017) and Kirstein *et al.* (2018) revealed that microbial communities associated with plastics displayed a high level of variation between both lifestyles. A core group of several single OTUs affiliated to JTB255 MBG, Erythrobacteraceae, Sphingobacteriales, Halieacea and Planctomycetaceae were found to be abundant on BF but were rarely observed from SW samples. Our SW samples exhibited a large number of OTUs affiliated to SAR11 clade Surface 1, Synechococcus, and SAR116 clade, commonly detected in SW (Giovannoni *et al.*, 1990; Coclet *et al.*, 2019), but rarely observed among BF. Moreover, bacterial interaction network analysis revealed that the OTUs observed in the two lifestyles may experience mutual exclusion or competition as they were mainly negatively correlated (Figure V-4). Taken together, our results denote biofilm as a distinct microbial niche in the marine environment, thus confirming previous studies which just reported a difference in community composition between immersed surfaces and the surrounding seawater (De Tender *et al.*, 2015; Ogonowski *et al.*, 2018).

V.2.5.2. Influence of sediments on biofilm microbial communities

The second goal of this study was to improve our understanding on spatial variations of the prokaryotic biofilm community structures especially between the surface and bottom of seawater column. Biofilm formed on immersed plates at the surface or bottom of water column had significantly different community structures, even considering shallow depth of Toulon Bay (*i.e.* 8-m depth on average). Thus, the strong differences between bacterial communities from both surface and bottom biofilms were probably due to variation of physico-chemical conditions of seawater column. However, analysis of the abiotic variables showed that the geochemical profile was homogeneous between the surface and bottom of seawater column. Members of Gammaproteobacteria (Arenicella, Haliaceae, BD1-7 clade, and JTB255 MBG), Bacteroidetes (Draconibacteriaceae, Cryomorphaceae, Flavobacteriaceae, and NS11-12 MG) and the Planctomycetes OM190 significantly discriminated bottom biofilm's communities from surface ones. All of these groups have been described from the "plastisphere" (*e.g.* glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene microplastics) of coastal environments (Zettler *et al.*, 2013; De Tender *et al.*, 2015; De Tender, Devriese, *et al.*, 2017).

Furthermore, most of these groups were also observed in contaminated sediments has been well reported in previous studies (Webster and Negri, 2006; Wang *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2018; Godoy-Lozano *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2019). Interestingly, the presence of Planctomycetes as biomarker of bottom biofilms in our study is consistent with the results obtained by Webster and Negri (Webster and Negri, 2006) in Antarctic marine biofilms established on glass surfaces near highly contaminated sediments. Finally, recent investigation of bacterial community structure in Toulon Bay demonstrated that Bacteroidetes and JTB255 MBG were indeed present in the sediment and in higher proportion in superficial than in deep sediments. Taken together our results suggest that surrounding superficial sediments could possibly serve as a direct source for the colonization of immersed substrates by opportunistic microorganisms (Battin *et al.*, 2001). Some of the microorganisms appear to exploit the water/sediment interface, rich in particles and surfaces to colonize (McDougald *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2017) and potentially resuspended during storm events or dredging activities.

V.2.5.3. Limited impact of chemical contaminant gradient on microbial biofilm

The third goal of this study was to improve our understanding on spatial variations of the prokaryotic biofilm community structures when covering sharp chemical gradients from inner to outer Toulon Bay. We observed a significant impact of the site of immersion on biofilm microbial communities but surprisingly unrelated to metal contamination gradients at the community scale. Conversely to planktonic communities (Coclet *et al.*, 2018, 2019), spatial structuration of biofilm communities seemed to be driven by other environmental factors than multichemical contamination or by biological processes. Complex natural biofilms include a diversity of organisms with different metabolic capacities and physiologies which generates opportunities for cooperation (Dang and Lovell, 2016; Flemming *et al.*, 2016; Kirstein *et al.*, 2018) and promote resistance to metallic stress (Harrison *et al.*, 2007). Interestingly, biofilms respond dynamically to pollutant substances which lead Flemming *et al.* (2016) to suggest that biofilms can be viewed as fortresses made of biofilm matrix. For example, in response to the exposure to toluene, biofilm was reported to produce EPS enriched in carboxyl groups which can lead to an increase in their ions exchange capacity (Harrison *et al.*, 2007; Flemming *et al.*, 2016). The matrices of biofilms can also accumulate metals such as Cu2+, Zn2+, Fe2+/3+, and Al3+, which protects the biofilm from the toxicity of

the metal ions (Harrison *et al.*, 2007; Grumbein *et al.*, 2014; Flemming *et al.*, 2016; McElroy *et al.*, 2016), especially when present at concentrations toxic to free-living cells like observed in Toulon Bay (Coclet *et al.*, 2018). Intuitively, the EPS matrix might seem to plausibly represent a diffusion barrier. EPS components of the matrix can substantially annihilate the activity of toxic substances that diffuse through the biofilm (Billings *et al.*, 2015). For example, copper can be complexed by polysaccharides in the matrix of gammaproteobacterial to protect the biofilm (Ordax *et al.*, 2010). Additionally, numerous mechanisms of detoxification in biofilm are well known and described in the literature including metabolic heterogeneity, extracellular signaling, metal immobilization and complexing, and uptake of resistance genes by HGT (Decho, 2000; Teitzel and Parsek, 2003; Harrison *et al.*, 2007; Mah, 2012). However, future studies are needed to specify if only pioneer microorganisms of biofilm possess mechanisms of resistance and if these mechanisms become minor after the formation of the matrix.

Although multi-contamination gradients didn't appear to have major impacts on the overall communities, some keystone OTUs, mainly OM190, BD1-7 clade, Tenacibaculum Flavobacteriaceae, JTB255 MBG, Flammeovirgaceae and Aquibacter still showed positive correlations with different trace metals (*i.e.* Cd, Cu, Mn). Recent findings have shown that contaminants could have positive interactions with microbial biofilm communities in Toulon Bay (Pollet *et al.*, 2018) and in other ecosystems (Chen *et al.*, 2014; McElroy *et al.*, 2016). Most of these groups have been identified as resistant to contaminants in biofilm communities (Yang *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2018). Additionally, positive correlations between DGT-labile Pb and only bottom OTU keystones could be confirm the importance of sediment resuspension processes. Thus, sediment closeness with bottom biofilm can have two main effects; the colonization of surfaces by benthic communities, as discussed above and the selection of OTUs already established in biofilm by remobilized contaminants.

Whether positive correlations with concentrations in trace metals could appear surprising, they could also indicate some links or co-occurrence with organic matter and organic contaminants. Indeed, the sediment of Toulon Bay is also known for its organic contamination by PAHs and PCBs, the contamination of these compounds increasing globally from South-East to North-West as for trace metals (Wafo *et al.*, 2016). Moreover, resuspension experiments have demonstrated that organic matter and PAH could efficiently be remobilized into the water column (Guigue *et al.*, 2017). Considering that remobilized

organic matter and PAH can sustain the growth of specific bacterial lineages (Quero *et al.*, 2015; Jeanbille *et al.*, 2016; Salerno *et al.*, 2018), multi-contaminated areas of Toulon Bay could provide more diverse ecological niches and could thus be inhabited by a more diverse microbial community. The presence of known hydrocarbonoclastic OTUs, including Erythrobacter and Hyphomonodaceae tend to confirm the influence of organic contaminants hypothesis (Dussud *et al.*, 2018). This hypothesis is also supported by our observation of a higher diversity in bottom biofilms and by previous observations demonstrating that microbial diversity was higher in the most contaminated sediments of Toulon Bay (Misson *et al.*, 2016). (Webster and Negri, 2006) also reported that organic (PAHs) pollution levels in sediments may have a direct impact on the community structure of microbial biofilms. Investigating sediment ecosystem with higher resolution methods in the Toulon bay could help to shed the light on the accurate role of both benthic communities and sediment contamination on biofilm formation and establishment in a multi-contaminated ecosystem.

V.2.6. Conclusion

This study provides one of the first detailed description of the natural and complex prokaryotic biofilm communities in a shallow marine coastal area. As this coastal ecosystem is highly anthropized and faces strong and multiple chemical contamination gradients, our study is important for a better understanding of the ecology of microbial biofilm in response to a set of environmental changes. We conclude that the benthic compartment can influence microbial biofilm communities by serving as a source of microorganisms for biofilm formation and establishment, even in a high contaminated ecosystem, as Toulon Bay. In a lesser extent, the abiotic environment, and especially under the influence of sediment remobilization, could also contribute in shaping microbial biofilm communities. However, the influence of trace metallic contamination on biofilm communities appeared to be much more limited than for bacterioplankton communities, highlighting resistance and/or resilience abilities of microbial biofilms facing chemical stress. While this work brings new evidences about benthos importance on biofilm lifestyle, future studies need to identify sediment microbial indicator taxa related to biofilm formation and to elucidate how and whether multiple contaminants from sediment remobilization influence the functioning of the biofilm compartment.

Acknowledgements

This study was supported by PREVENT research program (funded by Toulon University, Toulon-Provence-Méditerranée (TPM) and the Conseil Départemental du Var). C. Coclet PhD was funded by the Provence-Alpes-Côte d'Azur region and supported by TPM. The authors wish to thank the French Navy and the LASEM for diving and sampling assistance, Dr. G. Culioli (MAPIEM, Toulon, France) and L. Favre (MAPIEM, Toulon, France) for sampling and sample treatment assistance. The authors declare that they have no conflict of interest.

V.3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'impact de la contamination en ETM sur la densité et la structure des procaryotes hétérotrophes et autotrophes (bactéries, archées et cyanobactéries) dans les biofilms en surface et au fond de la colonne d'eau a été étudié. Ce chapitre constitue une des premières études décrivant la diversité taxonomique des procaryotes dans les biofilms marins à différentes profondeurs de la colonne d'eau et le long d'un gradient multiple de contamination en ETMs.

Les principaux résultats présentés dans ce chapitre ont permis de montrer que la contamination en ETM n'était pas le facteur majeur de la structuration des communautés de biofilm dans la rade de Toulon. Le comportement des biofilms vis-à-vis des contaminants est apparu très différent de celui des communautés planctoniques. Ces résultats tendent à montrer que les biofilms auraient une sensibilité plus faible face à une contamination en ETMs. Pour expliquer cette différence de sensibilité avec les communautés ultraplanctoniques, deux hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord, les capacités de résistance et d'adaptation des biofilms ont pu être supérieures à celles des communautés de bactérioplancton. Ensuite, la nature même du biofilm, avec la présence d'une matrice extracellulaire qui joue le rôle de barrière physique a pu aussi favoriser la protection des communautés de procaryotes à l'intérieur du biofilm face aux ETMs.

Si les ETM n'ont eu qu'une faible influence, la profondeur d'immersion des plaques a joué un rôle plus important dans la structuration des communautés de biofilm. En effet, la composition des biofilms proches des sédiments était très différente de celle des biofilms en surface de la colonne d'eau. Les communautés présentes dans le compartiment benthique environnant des biofilms ont pu participer à la colonisation des surfaces immergées. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence des relations fortes entre le compartiment planctonique et le compartiment biofilm durant cette étude. Ainsi, dans la rade de Toulon, la composition des communautés procaryotes dans les biofilms a semblé davantage influencée par les communautés benthiques environnantes que par la multicontamination en ETMs de la colonne d'eau. Toutefois, il est important de noter que la contamination des sédiments environnants, notamment en Pb, a pu influencer dans une moindre mesure la composition des communautés de procaryotes des biofilms de fond.

La contamination forte en ETM de la rade de Toulon est apparue moins structurante pour les communautés de biofilms que pour les communautés planctoniques. Toutefois, il apparaît nécessaire de valider ces observations de terrain par des études expérimentales en conditions contrôlées afin de réduire la complexité de l'écosystème étudié et étudier spécifiquement l'influence de certains métaux sur les communautés de procaryotes planctoniques et dans les biofilms. C'est dans cette optique que le chapitre VI propose de présenter l'effet spécifique des ETMs sur les communautés procaryotes et sur l'importance de l'historique de contamination de ces communautés par une approche expérimentale en laboratoire.

CHAPITRE VI. RÉPONSES SPÉCIFIQUES DES COMMUNAUTÉS DE PROCARYOTES À UNE CONTAMINATION MÉTALLIQUE REPRÉSENTATIVE DE LA RADE DE TOULON SELON LEUR PASSIF D'EXPOSITION

VI.1. Introduction du chapitre

Dans les chapitres précédents, les effets d'une contamination métallique multiple sur l'abondance, la diversité et la composition des communautés ultraplanctoniques dans un environnement marin côtier ont été présentés. Toutefois, les observations faites lors des campagnes de terrain dans un environnement naturel peuvent être le résultat d'interactions complexes entre plusieurs facteurs. En effet, les métaux peuvent interagir entre eux et avoir des effets additifs, synergiques ou antagonistes. Ils peuvent aussi interagir avec d'autres paramètres comme les nutriments ou la quantité et la qualité de la matière organique. Ces interactions peuvent réduire la toxicité des ETM ou favoriser la tolérance des communautés vis-à-vis de la contamination. D'autres paramètres comme la prédation ou l'hydrodynamisme peuvent aussi influencer le fonctionnement des environnements contaminés et rendre difficile la compréhension du rôle des ETM pour les communautés microbiennes.

Dans ce contexte, ce chapitre s'articule autour de deux expériences en mésocosmes au laboratoire. Ces mésocosmes ont consisté en 4 conditions de 20-L en triplicat. L'eau filtrée à 5-10 µm provenant de sites chimiquement contrastés dans la rade de Toulon a été utilisée. L'abondance et la structure des communautés de procaryotes planctoniques, déterminées par cytométrie en flux et par la technique de séquençage haut débit Illumina Miseq a été principalement étudiée. Une étude plus fine des effets d'une contamination en Cu et en Pb a été réalisé car ce sont les contaminants qui ont présenté les plus forts gradients de concentrations entre les zones peu contaminées et les zones très contaminées de la rade de Toulon. De plus, le Cu et le Pb représentent des sources de contamination différentes dans la rade de Toulon. La contamination en Cu provient généralement des activités nautiques, de l'utilisation des peintures antifouling et est habituellement retrouvées près des ports civils. La contamination en Pb provient majoritairement des sédiments contaminés et est, en général, retrouvée dans les zones enclavées du nord de la petite rade. Enfin, les mécanismes de toxicité

de ces deux contaminants varient et ils n'ont pas le même impact sur les communautés microbiennes. Ainsi, les principaux objectifs de cette étude étaient : (i) de mettre en évidence les effets spécifiques du Cu, du Pb et d'un cocktail des deux contaminants sur la communauté de procaryotes planctoniques provenant d'une zone très peu contaminée et (ii) de déterminer le potentiel adaptatif de ce type de communauté à une contamination en Cu via la comparaison de communautés présentant différents passifs d'exposition.

VI.2. The specific impacts of copper and lead exposure on bacterioplankton communities originating from contaminated contrasted coastal seawaters: the influence of exposure history

Cette partie est présentée sous la forme d'un article en préparation en vue d'une soumission dans *Sciences of the Total Environment.* Les références sont toutes présentes dans la partie Références à la fin de ce manuscrit.

Clément Coclet[1,2], Cédric Garnier[1], Sébastien D'onofrio[1], Gaël Durrieu[1], Nicolas Layglon[1], Dario Omanović[3], Mullot Jean-Ulrich[4], Jean-François Briand[2], Benjamin Misson[1,*]

[1] *Université de Toulon, Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), UM110, France.*

[2] *Université de Toulon, MAPIEM, EA 4323, Toulon, France.*

[3] *Ruđer Bošković Institute, Division for Marine and Environmental Research, Bijenička 54, Zagreb, Croatia.*

[4] *LASEM-Toulon, Base Navale De Toulon, BP 61, 83800 Toulon, France.*

[*]: corresponding author; email: misson@univ-tln.fr; tel: +33 494 146 746; Université de Toulon, CS60584, 83041 Toulon Cedex 9

VI.2.1. Introduction

In the last decades, coastal expansions coupled with anthropogenic pressures have enhanced marine contamination in coastal areas (Halpern *et al.*, 2008; The Mermex Group *et al.*, 2011). Copper (Cu) contamination in coastal areas is mainly caused by urban and industrial wastes (Levin *et al.*, 2001; Oursel *et al.*, 2013), or antifouling coatings specifically in harbors (Turner, 2010). Lead (Pb) contamination is mainly associated with historical short-term events (Xu *et al.*, 2014; Dang, Lenoble, *et al.*, 2015; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015) or historical fuel consumption for nautical traffic (Callender, 2003). If Cu remains mostly in the water column, Pb mainly accumulated in the sediment but can contaminate coastal seawater through resuspension (Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Layglon *et al.*, *Submitted*). Elevated Cu and Pb levels can be detected in many coastal areas all around the world (Schiff *et al.*, 2007; Cindrić *et al.*, 2015; Corcoll *et al.*, 2017; Egardt *et al.*, 2018). In Toulon Bay, Cu and Pb concentrations can be enriched up to more than 100-fold above geochemical background levels depending on the compartment (Casas *et al.*, 2008; Tessier *et al.*, 2011; Jean *et al.*, 2012; D. Cossa *et al.*, 2014; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Twining *et al.*, 2015; Coclet *et al.*, 2019). The originality of Toulon Bay is in gradual gradients of multiple trace metal elements (TMEs) from very low concentrations close to the open Mediterranean Sea to extremely high concentrations in the most enclosed and anthropized areas. Thus, Toulon bay appears as a model ecosystem to study the contribution of trace metallic contamination to marine microbial ecology.

The response of bacterioplankton communities to TMEs in natural marine coastal areas remains poorly investigated (Sheeba *et al.*, 2017; Coclet *et al.*, 2018, 2019; Goni-Urriza *et al.*, 2018). These studies clearly identified TMEs as structuring factors of abundance, diversity and composition of bacterioplanktonic communities. Especially in Toulon Bay, where contamination gradients are wider than classical physico-chemical gradients, TMEs explained the largest part of the variation of bacterioplanktonic diversity observed (Coclet *et al.*, 2019). The impacts of TMEs can also be direct or indirect, depending on the nature and the strength of interactions among bacterioplanktonic species and between bacterioplankton and phytoplankton (Goni-Urriza *et al.*, 2018; Coclet *et al.*, 2019). Indeed, previous studies reported that phytoplankton appeared very sensitive to TME contamination in coastal areas (Mackey *et al.*, 2012; Lafabrie *et al.*, 2013; Coclet *et al.*, 2018; Goni-Urriza *et al.*, 2018). Changes in phytoplankton composition and mortality induced by TME contamination can lead to

differences in both quantity and quality of exuded organic matter, that can be used by bacterioplankton communities for growth (Goni-Urriza *et al.*, 2018). Moreover, Goni-Urriza *et al.* (2018) suggested a relative tolerance of microbial communities to TME contamination, especially in chronically contaminated areas. This could be attributed to the selective enrichment of microorganisms by TMEs which promote the growth of metal resistant microorganisms (Sheeba *et al.*, 2017). Several groups, especially Alphaproteobacteria SAR11 and *Synechococcus* have been identified as relatively less abundant where TMEs concentrations where the highest while Flavobacteria, Betaproteobacteria or Gammaproteobacteria have been identified as resistant or tolerant to high concentrations of TMEs (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017; Coclet *et al.*, 2019). However, all of these studies were based on field studies conducted in multicontaminated sites, where variations of additional environmental conditions could explain changes in bacterioplankton community (Pinhassi *et al.*, 2004; Lozupone and Knight, 2007; Fuhrman *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2013). In a multicontaminated area, interactions among TMEs or between TMEs and organic matter or nutrients for example could also occur and result in additional, synergistic or antagonistic effects (Lorenzo *et al.*, 2002). Following detailed field description, mesocosms-based experiment, providing comparative conditions of a specific ecosystem and allowing to control several environmental variables, is a useful strategy to study hypotheses associated with specific effects of contaminants on bacterioplankton communities. Then, a recent microcosm-based study revealed that artificial mixture of contaminants (nutrients, metals, and herbicides) induced a strong inhibition of growth, production, respiration and significant modifications of the functional patterns of bacterioplankton (Pringault *et al.*, 2016). However, no further information about the phylogenic diversity and structure of bacterioplankton affected by this mixture has been analyzed in this study and specific TME impacts were not investigated. In addition, both industrial effluent discharge and the resuspension of metal-contaminated marine sediments were shown to increase microbial diversity in a resuspension experiment (Zouch *et al.*, 2018). Some Flavobacteriaceae members were identified as dominant species in these experiments with acidic wastewaters, with increasing dissolved Cd concentrations (Zouch *et al.*, 2018). Two additional studies reported that cadmium (Cd) impacted both alpha- and beta-diversities of bacterioplankton communities by contributing to hydrocarbon-degrading members development in the community (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017). However, to our best

knowledge, no study has focused on the specific effects of Cu or Pb and on a co-exposure of both metals on diversity and composition of complex bacterioplankton communities from natural marine coastal ecosystem.

Furthermore, in contaminated ecosystems, the impacts of contamination on bacterioplankton may also be influenced by long-term exposure to TME contamination. Previous TME exposition can lead to an increase of metal tolerance in microbial communities by the elimination of the most sensitive individuals and the replacement of sensitive species by tolerant ones (Gustavson *et al.*, 1999). This stimulates pollution-induced community tolerance (PICT), which has been primarily revealed by a measure of the sensitivity of biological communities to TME (Blanck *et al.*, 1988; Blanck, 2002). For exemple, Serra *et al.* (2009) found that copper pulse exposure may be toxic to periphyton communities while continuous copper exposure may lead to community adaptation, which is often related to changes in species composition. However, if numerous studies developed PICT approach based on photosynthetic efficiency, extracellular enzyme activities or respiration activity (Carman *et al.*, 2000; Soldo *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2009; Tlili, 2013), little is known about how metal exposure impact diversity of bacterioplankton already exposed to a long-term contamination.

In this study, we performed a first mesocosm experiment in order to assess the effects of Cu or/and Pb exposure over 5 weeks on the abundance, diversity and structure of a bacterioplankton community from a very few contaminated coastal seawater. Cu and Pb spikes were used to target the highest total concentrations observed for surface water in Toulon Bay, *i.e.* 150nM for Cu and 7nM for Pb (Coclet *et al.*, 2018, 2019). Flow cytometry was used to estimate microbial abundances while high-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons was used for diversity and structure analyses. Given the large difference observed in response to Cu or Pb, a second mesocosm experiment was then carried out with similar methods to focus on the specific effects of Cu exposure on bacterioplankton communities from both moderately and strongly contaminated seawaters of Toulon Bay. This second experiment allowed us to assess the influence of exposure history on the adaptive potential and the metal resistance capacity of coastal bacterioplankton.

VI.2.2. Materials and methods

VI.2.2.1. Study area

Toulon Bay, located in the northwestern part of the Mediterranean Sea, is divided into two non-equivalent parts by a seawall: the Little Bay (~9.8 km^2), which is semi-enclosed, and the Large Bay (~42 km^2), which opens onto to the Mediterranean Sea (Figure VI-1). The Little Bay is characterized by a high level of anthropic activities (the largest French Navy harbor, 3 civil harbors, ferry transport, industries, and aquaculture). Moreover, because of the seawall, the Little Bay is less affected than the Large Bay by offshore hydrodynamics and presents higher average water residence time (Dufresne *et al.*, 2014). This confers to the Little bay a higher trace metal contamination than the Large Bay as demonstrated previously in the sediments (Tessier *et al.*, 2011; Dang, Lenoble, *et al.*, 2014) as well as in the water column (Coclet *et al.*, 2018, 2019).

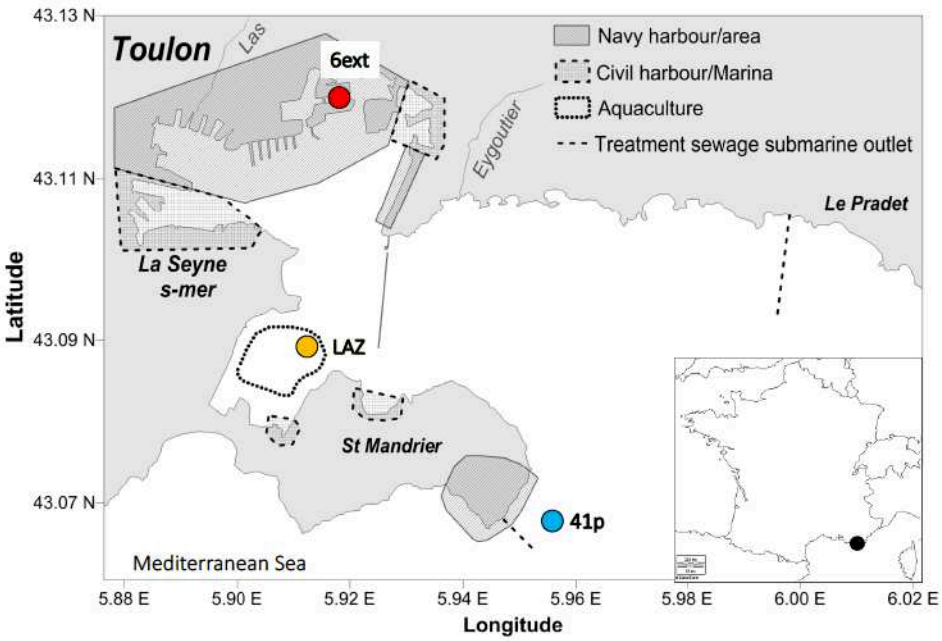


Figure VI-1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites. Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively

VI.2.2.2. Seawater collection, processing, and storage

All the sampling material, bottles, tanks, and filters were pre-cleaned following rigorous protocols, detailed in ANNEXE E and in (Coclet *et al.*, 2019), in order to keep metals' concentrations as close as possible to their initial levels.

Seawater used for the first mesocosm experiment was collected at 1-m depth from site 41p (Figure VI-1) on May 10th, 2016 and seawater used for the second mesocosm experiment was collected at 1-m depth from both sites LAZ and 6ext on Mai 2nd, 2017 (Figure VI-1). Details on sample's information are given in the Table E- 1. Seawater was collected using an air-compressed Teflon pump (AstiPure™ II, Saint-Gobin) connected with Teflon tubing. It was filtered on site through a 5-10 µm cellulose Polycap filter (Whatman) connected to the Teflon tubing after the pump in order to remove the largest grazers. Filtered seawater was collected in 50-L low-density polyethylene (LDPE) tanks (Nalgene). Back to the lab, each mesocosm was filled with 20-L of filtered seawater. The remaining seawater was filtered through 0.2 µm Teflon Polycap filters (Whatman) to eliminate all organisms, then stored at 4°C and subsequently used to re-fill mesocosms during the experiment.

VI.2.2.3. Mesocosm setup, and experimental design

For both mesocosm studies, twelve 20-L LDPE tanks (Nalgene) were filled with 5-10 µm filtered water, and thus include a natural seawater microbial community mainly composed of free-living organisms. Seawater in each tank was continuously mixed with a Teflon magnetic stir bar used at low speed and oxygenized with 0.2 µm-filtered and humidified ambient. The 12 tanks were submitted to a daily light/dark cycle of 14/10h, using full solar spectrum aquariophilly neon tubes and a surface light irradiance of 50 $\mu mol.m^2.s^1$ of white light. The first year, the room temperature and the mesocosm interior were kept constant at 19 ± 1.6°C and 23 ± 1.5°C, respectively. The second year, the room temperature and the mesocosm interior were kept constant at 22 ± 2.0°C and at 19 ± 2.2°C, respectively. To maintain resource availability during the experiments, each tank had a continuous opened water recirculation system, using a peristaltic pump (Minipuls Evolution®, Gilson), to renew 50% of the total water volume in a week by 0.2 µm filtered water. All the experimental material (tanks, light, magnetic stirrers, circulation and aeration systems) were enclosed in a large box covered of

plastics in order to avoid contamination in TMEs from ambient particles. Fresh air was continuously provided inside the box by a filtered-equipped fan in order to avoid humidity accumulation or over-heating by the light system.

The first mesocosm was performed from May 10th to June 17th, 2016 over a 6-week period. Twelve pre-cleaned 20-L LDPE (Nalgene®) tanks were filled with 5-10 µm filtered water from site 41p (Figure VI-1). A 2-week acclimation period was carried out to establish relatively stable conditions in each tank. After the acclimation period, seawater from the 12 tanks was pooled, homogenized and then tanks were re-filled. Following the acclimation period, seawater in tanks from the first mesocosm study were assigned to four treatments: (1) site 41p control (41p CTRL) (*i.e.* no pollutant added to 41p seawater), (2) Cu addition (41p Cu), Pb addition (41p Pb), and (4) Cu and Pb addition (41p Cu+Pb) (Figure VI-2). The Cu treatments were spiked with a stock solution of Cu nitrate (1 $g.L^{-1}$) and the Pb treatments were spiked with a stock solution of Pb nitrate (10^{-3} M). According to the initial Cu and Pb concentrations measured in the 41p seawater used to fill the tanks, final concentrations of 150 nM and 7 nM for Cu and Pb respectively, were targeted. The water supplies were previously spiked with similar concentrations of Cu, Pb, or both depending of treatment to maintain metal concentrations in tanks.

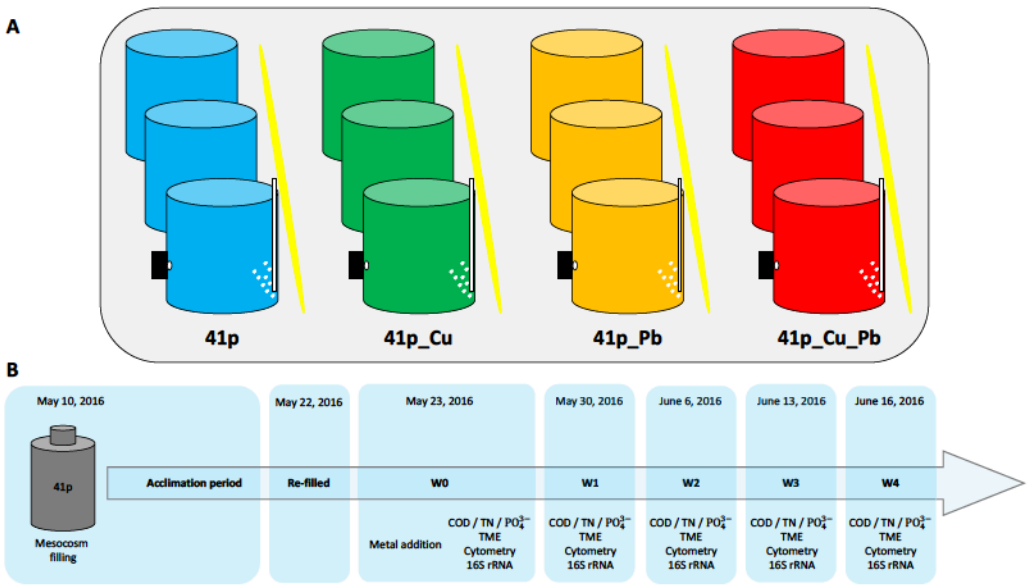


Figure VI-2 Layout of the experimental conditions (A) and experimental timeline (B) for the first mesocosm experiment.

The second mesocosm was performed from May 2nd to June 12th, 2017 over a 6-week period. Six 20-L LDPE (Nalgene®) tanks were filled with 5-10 µm filtered water from each sampling site (LAZ and 6ext sites, Figure VI-1). The treatments in the second mesocosm experiment were (1) site LAZ control (LAZ CTRL) (*i.e.* no pollutant added to LAZ seawater), (2) Cu addition to LAZ seawater (LAZ Cu), (3) site 6ext control (6ext CTRL) (*i.e.* no pollutant added to 6ext seawater), and (4) Cu addition to 6ext seawater (6ext Cu) (Figure VI-3). The Cu treatments were spiked with a stock solution of Cu nitrate (1 $g.L^{-1}$). According to the initial Cu concentrations measured in LAZ and 6ext seawaters used to fill the tanks, final concentration of 150 nM for Cu were targeted. The supplied water was previously spiked with Cu depending of treatment to maintain metal concentrations in tanks.

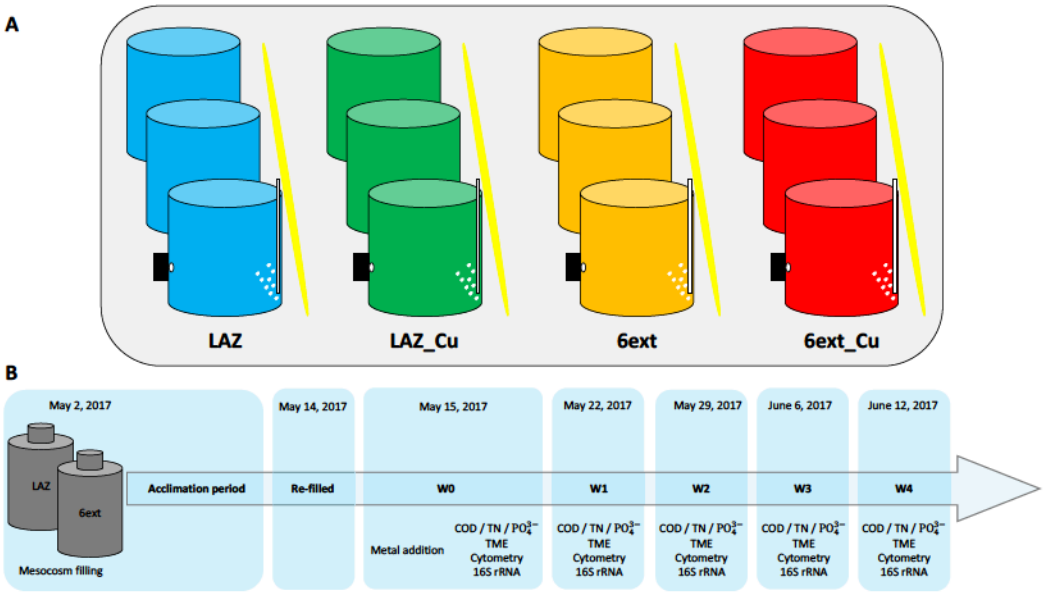


Figure VI-3 Layout of the experimental conditions (A) and experimental timeline (B) for the second mesocosm experiment.

VI.2.2.4. Experimental time plan and sampling

After the acclimation period, seawater was sampled from the 12 tanks using a peristaltic pump connected with Teflon tubing at 5 different times over the course of both mesocosm experiments: 0, 7, 14, 21 and 25 days after the Cu/Pb spikes. At each sampling time, 333 mL of seawater was sampled in each replicate of a given experimental condition and pooled in 1L FEP bottles (Nalgene) to obtain composite samples for each condition. It was then

immediately resampled for future trace metals (TM), dissolved organic carbon (DOC), total nitrogen (TN) and phosphate (PO_4^{3-}) quantifications. Subsamples for dissolved TM concentrations (125-mL) were filtered on 0.2 µm cellulose nitrate syringe filter (Sartorius), stored in fluorinated ethylene propylene (FEP) bottles (Nalgene), acidified with HNO_3 (suprapur, Merck) to pH < 2, and irradiated directly in FEP bottles by UV light (150-W mercury lamp, Hanau, Germany) for at least 24 h in order to decompose natural organic matter (Cindrić *et al.*, 2015). Subsamples (24-mL) for DOC and TN quantification were filtered on 0.2 µm cellulose nitrate syringe filter (Sartorius), stored in pre-calcined (4h, 450 °C) glass tubes with a Teflon/silicon septum (Wheaton), and preserved in 0.012 M HCl (TraceSelect, Fluka) at 4°C. Subsamples (50-mL) for phosphate (PO_4^{3-}) analysis were collected in centrifuge tubes (Falcon) and stored at -20°C until analysis.

Additionally, seawater (10-mL) for flow cytometry analysis were directly collected in 15-mL centrifuge tubes (Falcon) from each of 12 tanks, fixed with 0.25% (final concentration) glutaraldehyde, and stored at -80°C until analysis.

Finally, at each sampling time, 1-L of seawater from each of 12 tanks was collected in 1-L HDPE bottles and filtered through 0.2 µm polycarbonate membranes (Millipore). Filters were stored at -80°C until DNA extraction.

VI.2.2.5. Seawater physico-chemical measurements and analyses

Temperature (°C), pH, dissolved oxygen concentration ($mg.L^{-1}$) and saturation (%) were directly monitored daily into tanks, over the course of both mesocosm experiments, using HQ40d (Hach) and LDO10105 (Hach) multiparameter probes.

Differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) was used to measure Cd, Cu, Pb, and Zn dissolved concentrations. Measurements were performed on a fully automated system based on a homemade autosampler (developed in our laboratory) and five Cavro XE 1000 syringe pumps for standard additions, an AutoBalll (EcoChemie) potentiostat, and a VA663 (Metrohm) mercury drop electrode, controlled by GPES 4.9 software (EcoChemie). Details about instruments, analysis conditions, and data treatment are provided elsewhere (Oursel *et al.*, 2013; Cindrić *et al.*, 2015).

DOC concentrations were determined using a TOC-V_{CSH} analyzer (Shimadzu) (further details in Dang, Tessier, *et al.*, 2014; Coclet *et al.*, 2018, 2019). Concentrations in PO_4^{3-} were

determined using a UV 1800 Shimadzu Spectrophotometer and micro cell Quartz SUPRASIL®, 50-mm light path (Hellma Analytics), based on the MAGnesium Induced Coprecipitation (MAGIC) method (Rimmelin and Moutin, 2005).

VI.2.2.6. Flow cytometry analysis

Autotrophic prokaryotes (*Synechococcus*-like, SYN), photosynthetic picoeukaryotes (PPE) and photosynthetic nanoeukaryotes (PNE) populations were characterized and enumerated using a BD Accury™ C6 (BD Biosciences) flow cytometer, as previously described (Coclet *et al.*, 2018, 2019). Heterotrophic prokaryotes were enumerated after staining with SYBR Green as previously described (Cabrol *et al.*, 2017).

VI.2.2.7. DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of 16S rRNA gene amplicons

DNA was extracted from the polycarbonate filters by a combination of enzymatic cell lysis (Ghiglione *et al.*, 2009) and AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The protocol for the DNA extraction and the library preparation is fully described in Coclet *et al.* (2019). We assessed heterotrophic prokaryotic community composition by targeting the V4-V5 region of the 16S rRNA gene (Parada *et al.*, 2016) and using Illumina Miseq 2 x 250pb paired-end sequencing (Genoscreen, France).

VI.2.2.8. Bioinformatic analysis

Sequences were demultiplexed and assigned to corresponding samples using CASAVA (Illumina). We noticed that we performed bioinformatic analysis on sequences from two sequencing analyses. Having dataset from only one sequencing analysis would have been more usual. However, we remain confident, considering the same DNA extraction, the same primers, the same PCR amplification and the same sequencing laboratory for our two mesocosm experiments, that our data are robust. The analysis of the raw sequences was done by following the standard pipeline of DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) in RStudio (R Core Team, 2017) with the following parameters: maxN= 0, maxEE= c(2,2), truncQ= 2. Briefly, the package

includes the following steps: filtering, dereplication, sample inference, chimera identification, and merging of paired-end reads. DADA2 infers exact amplicon sequence variants (ASVs) from sequencing data, instead of building operational taxonomic units from sequence similarity. The taxonomy assignments were done with the SILVA v.128 database (Pruesse *et al.*, 2007; Quast *et al.*, 2013) and the "assignTaxonomy" function in DADA2. For some ASVs, in order to obtain a finer taxonomical resolution, DADA2 package implements a method to make species level assignments based on exact matching between ASVs and sequenced reference strains in the SILVA v.128 database, using "addSpecies" function. Low abundance ASV (<0.005%) were filtered as recommended by Bokulich *et al.* (2013). Sequences classified as mitochondria or chloroplast were removed from the ASV table. The datasets from the samples were normalized by random subsampling to include an equal number of reads. Samples with lower number of sequences than the number of reads chose to the normalization were discarded.

VI.2.2.9. Statistical analysis

All plots and statistical analyses were performed with RStudio (R Core Team, 2017). Alpha diversity and error estimates were performed using QIIME script core_diversity_analyses.py (Caporaso *et al.*, 2010), including Chao1, equitability, observed richness, Shannon and Simpson's diversity. Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied to investigate the influences of Cu and Pb addition, experimental time, and their interaction on alpha-diversity metrics and the abundance heterotrophic microbial community. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) based on Bray-Curtis distance was applied to evaluate the overall differences in heterotrophic microbial community structure, using the *vegan* package in R (Oksanen *et al.*, 2016). Global and pairwise PERMANOVA tests, using *vegan* and *RVAideMemoire* packages, respectively were applied to test significant differences between treatments and sampling time. To find representative phylotypes associated with the treatments, similarity percentage (SIMPER) analyses were first applied to screen OTUs primarily responsible for the overall dissimilarity (*i.e.* contributing to more than 1% of total dissimilarity) in the prokaryotic communities between treatments at each time point using *vegan* package.

VI.2.3. Results

VI.2.3.1. Physico-chemical characterization of seawater in mesocosms

The physico-chemical variables were monitored in initial seawater and at each sampling time to investigate the environmental quality of seawater in both mesocosm experiments (Table E-2 and Table E- 3). Initial seawater samples used for the first (*i.e.* 41p) and the second (*i.e.* LAZ and 6ext) experiments were geochemically contrasted and presented variations in trace metal concentrations. Total Cu, Pb, and Zn in 6ext seawater were 2.5-, 3-, and 3.6-fold higher than in LAZ respectively, and 15-, 18-, and 26-fold higher than in 41p respectively. The DOC and TN concentrations were not significantly different between initial seawaters.

At the beginning of the mesocosm experiments, trace metal concentrations measured in control conditions were closed to the ones encountered in initial seawater samples from 41p, LAZ, 6ext. Thus, this confirms that no adsorption or contamination in metals occurred because of experimental materials (tanks, Teflon tubing, and pump). In the first mesocosm experiment, 135 nM and 7 nM of Cu and Pb respectively were measured after metal addition (T0), which were closed to the targeted concentrations (*i.e.* 150 nM and 7 nM for Cu and Pb). In the second mesocosm experiment, 160 nM of Cu were really added after Cu addition (T0). Finally, metal concentrations (*i.e.* Cu, Pb, and Zn) measured at the beginning and at the end of each experiment were closed, attesting that the expected trace metal levels remained constant during the entire of both mesocosm experiment.

For both mesocosm experiments, water temperature, pH, DO, and DOC did not exhibit significant differences among conditions but all of these parameters experienced temporal significant changes during the entire course of experiments (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Thus, average water temperatures were 21 ± 1.0°C, and 21 ± 1.6°C for the first and the second experiment respectively, with lowest temperatures recorded at the beginning of both experiments and highest values recorded at the end of both experiments. Average pH, DO, and DOC were 8.2 ± 0.01, 110 ± 0.2%, and 1.31 ± 0.01 $mg.C.L^{-1}$ respectively, during the first mesocosm. For the second mesocosm, average pH, DO, and DOC were 8.2 ± 0.0, 105 ± 0.2%, and 1.3 ± 0.0 $mg.C.L^{-1}$ respectively. Globally, for both mesocosm experiments, pH increased with time while DO saturation and DOC concentration decreased with time.

VI.2.3.2. Ultraphytoplanktonic and heterotrophic prokaryotes abundance

The abundance of three ultraphytoplanktonic (*i.e. Synechococcus*-like, picoeukaryote-like and nanoeukaryote-like) groups and heterotrophic prokaryotes were considered in the experiments. For the first mesocosm experiment, total abundance of ultraphytoplankton appeared similar between initial seawater from 41p and both conditions 41p CTRL and 41p Pb, with low temporal variability during the entire course of experiment (1.1 ± 0.1 x 10^4 cell.mL^{-1} on average) (Figure VI-4A). In conditions 41p Cu and 41p Cu+Pb, the total abundance of ultraphytoplankton started to decrease 3 days after metal addition, leading to significantly lower abundances than in conditions 41p CTRL and 41p Pb from 7 days after metal addition to the end of the experiment (ANOVA, $P < 0.001$). The minimal abundance reached 0.3% of initial abundance. At the beginning of the experiment (T0), heterotrophic bacteria abundance measured in all conditions (11 ± 0.3 x 10^4 cell.mL^{-1} on average) was significantly lower than in initial seawater from the 41p site (2.5 x 10^5 cell.mL^{-1}) (ANOVA, $P < 0.001$) (Figure VI-4B). From three days after metal addition to the end of the experiment, heterotrophic bacterial abundance was significantly higher in conditions 41p Cu and 41p Cu+Pb than in conditions 41p CTRL and 41p Pb until the end of the experiment (ANOVA, $P < 0.001$).

For the second mesocosm experiment, total abundance of ultraphytoplankton in LAZ (1.9 x 10^4 cell.mL^{-1}) was significantly higher than in 6ext seawater (7.9 x 10^3 cell.mL^{-1}) (ANOVA, $P < 0.001$). After the acclimation period (T0), total abundance of ultraphytoplankton was similar in all conditions (Figure VI-5A). In all conditions, the total abundance of ultraphytoplankton started to decrease 3 days after metal addition, leading to significantly lower abundances than in both LAZ and 6ext initial seawaters. From 3 days after metal addition to the end of the experiment, the total abundance of ultraphytoplankton were lower in Cu-treated conditions than in both LAZ and 6ext control conditions (ANOVA, $P < 0.001$). Finally, the total abundance of ultraphytoplankton in LAZ and 6ext after Cu addition was not significantly different during the entire course of the experiment. Heterotrophic bacteria abundance was not significantly different between LAZ (5.8 x 10^5 cell.mL^{-1}) and 6ext (5.0 x 10^5 cell.mL^{-1}) initial seawaters (Figure VI-5B). At the beginning of the experiment (T0), heterotrophic bacteria abundance was similar in all conditions (41 ± 1.0 x 10^4 cell.mL^{-1}). From 7 days after metal addition to the 17 days, heterotrophic bacteria abundance was higher in Cu-treated conditions than in control conditions (ANOVA, $P < 0.001$). From 21 days after metal

addition to the end of the experiment, heterotrophic bacteria abundance was similar in 6ext CTRL and 6ext Cu while heterotrophic bacteria abundance in LAZ Cu was still higher than in LAZ CTRL.

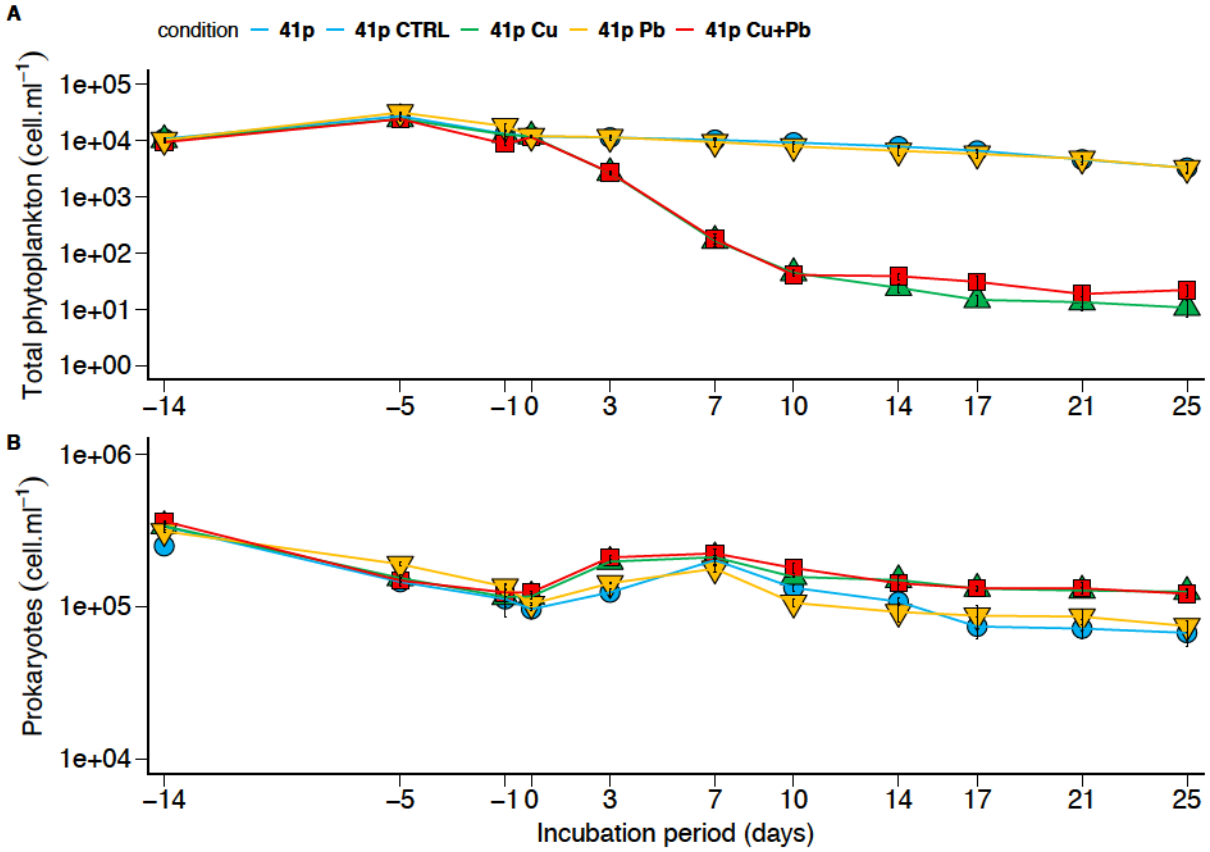


Figure VI-4 Total ultraphytoplankton (A) and total prokaryote (B) abundance (cell.mL^{-1}) dynamics during the first mesocosm experiment. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively.

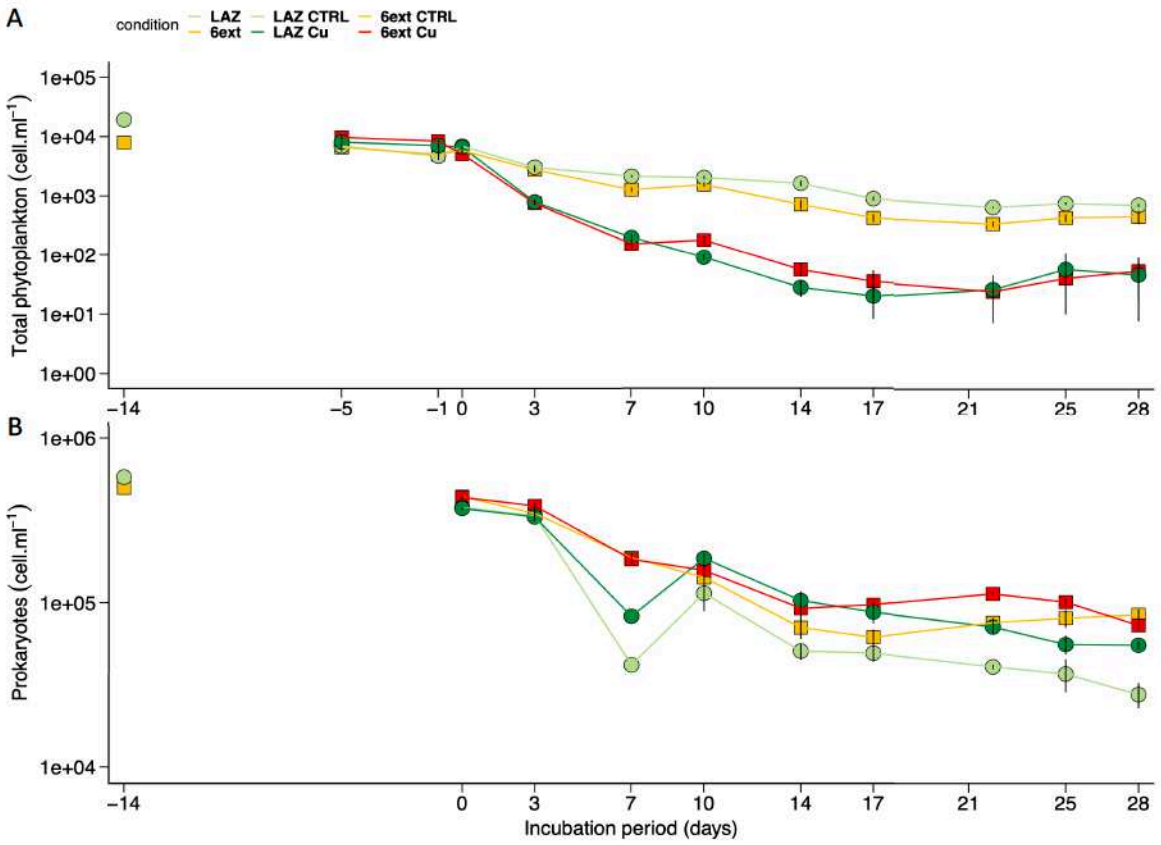


Figure VI-5 Total ultraphytoplankton (A) and total prokaryote (B) abundance (cell.mL^{-1}) dynamics during the second mesocosm experiment. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively.

VI.2.3.3. Prokaryotic alpha-diversity

For the first mesocosm experiment, all the α-diversity indices except equitability varied significantly over time (Tableau VI-1A and Figure E- 1). Globally, bacterial α-diversity indices significantly decreased over time in all conditions (ANOVA, $P < 0.05$). After the metal addition (T0), Chao1 index was significantly lower in Cu-treated conditions (*i.e.* 41p Cu and 41p Cu+Pb) relative to both initial seawater from 41p and condition 41p CTRL (ANOVA, $P < 0.001$). Simpson's diversity was significantly higher in metal-treated conditions (*i.e.* 41p Cu, 41p Pb, and 41p Cu+Pb) relatively to condition 41p CTRL (ANOVA, $P < 0.001$). No significant difference was observed in equitability, observed richness, and Shannon indices between conditions.

A	Chao1		Equitability		Observed OTUs		Shannon		Simpson	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Time	8.629	**< 0.001**	1.392	0.261	8.078	**< 0.001**	5.651	**0.001**	6.923	**< 0.001**
Condition	3.718	**0.024**	1.386	0.270	2.450	0.087	0.618	0.610	3.367	**0.034**
Time x Condition	3.499	**0.005**	0.994	0.478	2.890	**0.014**	1.829	0.102	3.624	**0.004**

B	Chao1		Equitability		Observed OTUs		Shannon		Simpson	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Time	8.277	**< 0.001**	54.442	**< 0.001**	13.995	**< 0.001**	62.274	**< 0.001**	29.640	**< 0.001**
Condition	11.003	**< 0.001**	0.686	0.606	11.892	**< 0.001**	3.268	**0.020**	1.719	0.163
Time x Condition	2.258	**0.025**	1.993	**0.048**	2.346	**0.020**	2.852	**0.006**	2.287	**0.023**

Tableau VI-1 Two-way analysis of variance (ANOVA) for alpha diversity indexes of seawater across different conditions and sampling times for the first (A) and the second (B) mesocosm experiment.

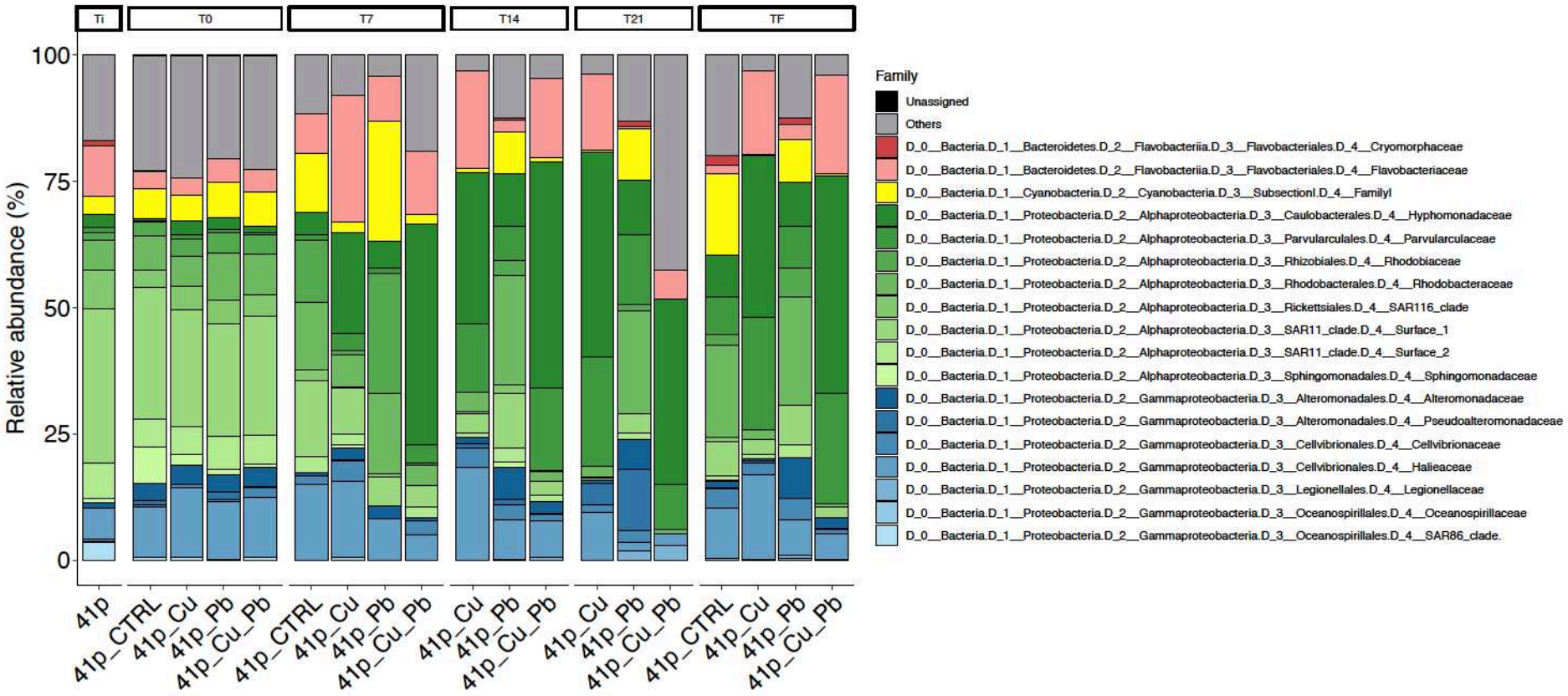


Figure VI-6 Composition of heterotrophic microbial community at the family level in 41p seawater and in the 4 conditions over the entire course of the first mesocosm experiment. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. Families that on average comprised less than 1% of the libraries are grouped as "Others."

For the second mesocosm experiment, all the α-diversity indices except equitability varied significantly over time (Tableau VI-1B and Figure E- 2). All bacterial α-diversity indices significantly decreased over time in all conditions, especially after the 7th day of the experiment (ANOVA, $P < 0.05$). Average Chao1, observed OTUs, and Shannon indices varied across conditions, and they were lower in condition LAZ Cu relative to LAZ CTRL and other conditions (ANOVA, $P < 0.05$). No significant difference was observed in all α-diversity indices between conditions 6ext CTRL and 6ext Cu. Finally, all α-diversity indices measured in the second mesocosm experiment were lower compared with those of the first mesocosm experiment.

VI.2.3.4. Prokaryotic community composition strongly shaped by Cu in contrast to Pb

VI.2.3.4.1. Taxon distribution and prokaryotic community structure

In the first mesocosm, the most abundant dominant phyla/classes (> 1% of all sequences across all samples) were Alphaproteobacteria (58 ± 1.2%), Gammaproteobacteria (19 ± 0.88%), Flavobacteriia (10 ± 1.2%) and Cyanobacteria (9.0 ± 1.2%). At the family taxonomic rank, Hyphomonadacea (17 ± 2.6%), SAR11 clade Surface 1 (12 ± 1.6%), Halieaceae (10 ± 0.72%), Flavobacteriaceae (9.9 ± 1.2%), Rhodobacteraceae (8.7 ± 1.1%), Parvularculaceae (7.8 ± 1.3%), and Family I (Cyanobacteria) (5.5 ± 0.83%) comprised the majority of the total sequences (Figure VI-6). Finally, Archaea represented less than 1% of the microbial community of all samples. Thus, we considered Archaea as rare taxa in the further analyses.

Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) plot and global PERMANOVA tests showed that the samples of the first mesocosm were clustered by both sampling times and conditions (Figure VI-7), and segregation was the highest at the order and family taxonomic ranks (Table E- 4A). Except at the phylum rank, condition clustering (PERMANOVA, $R^2 = 0.41$; $P < 0.001$) showed a greater influence on community variation than time clustering (PERMANOVA, $R^2 = 0.34$; $P < 0.001$) or interaction (PERMANOVA, $R^2 = 0.17$; $P < 0.001$) (Table E- 4). At the beginning of the experiment (T0), pairwise PERMANOVA showed that the bacterial community structures were similar between all conditions, and they were significantly different to the initial seawater from 41p (Table E- 4B). After the 7th day, significant differences between Cu-treated conditions (41p Cu and 41p Cu+Pb) and the other

conditions (41p, 41p CTRL, and 41p Pb) at each sampling time were clearly observed. Bray-Curtis distance between Cu-treated conditions and the other conditions at each time reached its maximum at the end of the experiment (TF), indicating that the bacterial communities in Cu-treated conditions tended to gradually diverge from other conditions from the 7th day, and until the end of the experiment. Furthermore, pairwise PERMANOVA showed no significant difference in communities neither between 41p CTRL and 41p Pb nor between 41p Cu and 41p Cu+Pb at each sampling time (Table E- 4B).

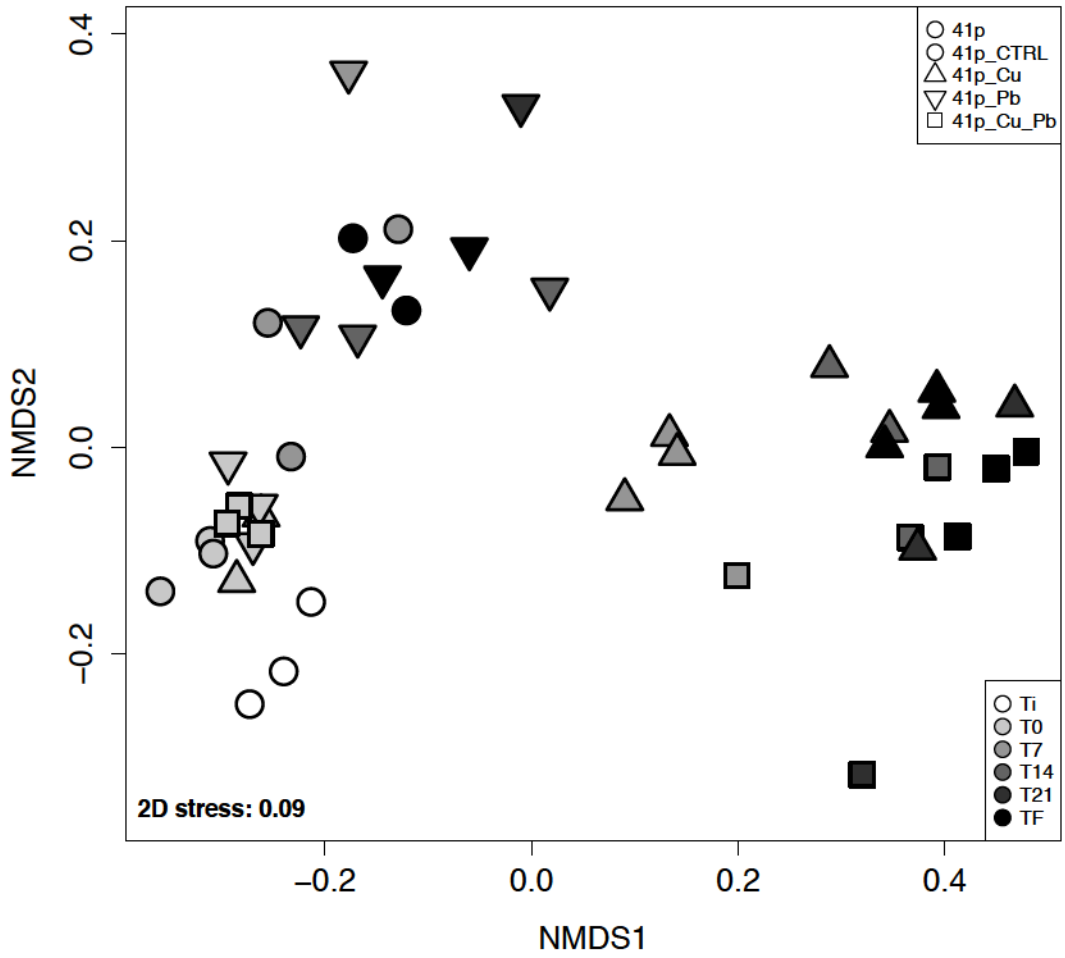


Figure VI-7 Non-metric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray–Curtis dissimilarity for 16S rRNA gene libraries between the different conditions at different sampling times of the first mesocosm experiment. Each symbol corresponds to a distinct condition, time and replicate. Empty symbols represent initial seawater samples.

VI.2.3.4.2. Representative taxa responsible for structural change over the duration of the experiment

In addition to PERMANOVA analyses, SIMPER tests were conducted in order to highlight prokaryotic families and genera that significantly contributed to the differences observed between treatments over time during the first mesocosm experiment.

Within the abundant families (> 1% of all sequences across all samples), 10 representative families were significantly discriminating treatments along the experiment (Table E- 5). This is in accordance with the relative abundances shown in Figure VI-6, where Rhodobacteraceae, Family I (Cyanobacteria), Alteromonadaceae, and SAR11 Surface 1 decreased in Cu-treated conditions compared to 41p CTRL or 41p Pb and contributed to 20 ± 1.3%, 16 ± 4.6%, 6.7 ± 2.5%, and 3.0 ± 0.76% respectively of the overall dissimilarity between these two groups of conditions. Conversely, the relative abundances of Hyphomonadaceae, Flavobacteriaceae, and Halieaceae increased in Cu-treated conditions compared to 41p CTRL or 41p Pb and contributed to 34 ± 8.1%, 17 ± 4.4%, and 4.8 ± 1.6% respectively of the overall dissimilarity between these two groups of conditions.

At a lower taxonomic rank, among the 176 genera recorded, only 19 significantly discriminated experimental conditions at the end of the experiment (TF) (Figure VI-8 and Table E- 6). Alphaproteobacterial genera, mainly *Rhodobium, Litorimocrobium*, and *Candidatus Pelagibacter*, cyanobacterial genus *Synechococcus*, flavobacteriial genus *Cryomorphaceae*, gammaproteobacterial genera *Glaciecola* and in a lesser extend CHAB XI 27, decreased in Cu-treated conditions compared to 41p CTRL or 41p Pb and contributed to 48 ± 16% of the overall dissimilarity between these two groups of conditions. Conversely, Alphaproteobacterial genera, mainly *Hirschia*, *Hyphomonadaceae,* and *Maricaulis*, flavobacterial genus NS5 marine group and gammaproteobacterial genus OM60(NOR5) clade increased in Cu-treated conditions compared to 41p CTRL or 41p Pb and contributed to 60 ± 17% of the overall dissimilarity between these two groups of conditions. Finally, *Alteromonas, Erytrhrobacter*, and *Glaciecola* were responsible for the structural change in Pb-treated condition. The relative abundance of *Glaciecola* taxon significantly increased while *Erythrobacter* nearly disappeared when only Pb was added.

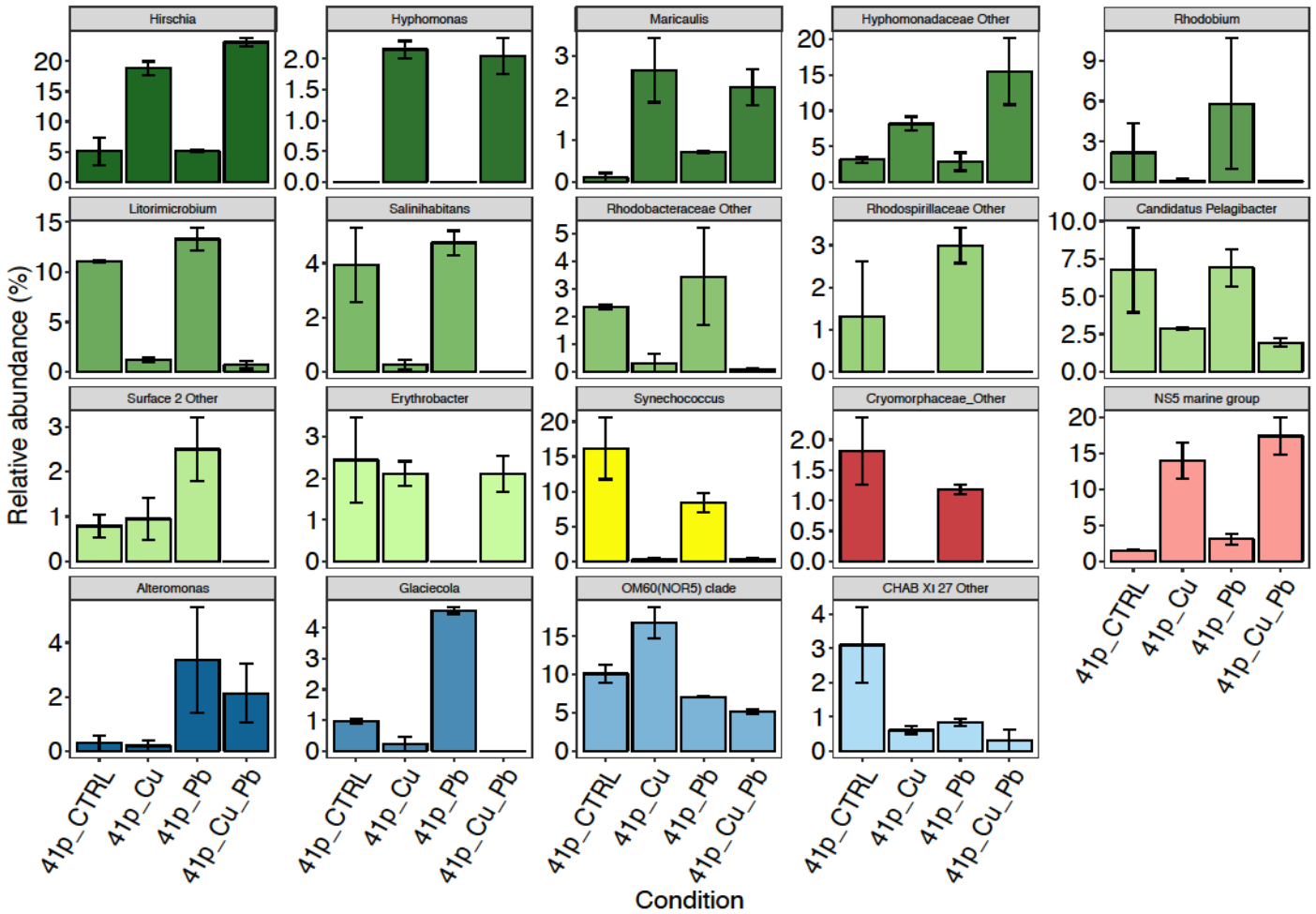


Figure VI-8 Relative abundance of genera found at week 5 (TF) of the first mesocosm experiment showing significant differences in abundance between conditions (SIMPER). Error bars represent the standard deviation (n = 3). Specific contribution (%) of particular genera to total dissimilarity between prokaryotic communities of two conditions using SIMPER is detailed in Table E- 6.

VI.2.3.5. Influence of metal exposure history on copper effects

VI.2.3.5.1. Taxon distribution and bacterial community structure

In order to compare the influence of metal pre-exposure on copper effects, we analyzed Cu-specific responses of bacterioplankton communities sampled from 3 geochemically contrasted sites: a very few contaminated site (41p), an intermediately contaminated site (LAZ), and a highly contaminated site (6ext). The most abundant dominant phyla/classes (> 1% of all sequences across all samples) were Alphaproteobacteria (54 ± 1.2%), Gammaproteobacteria (20 ± 0.90%), Flavobacteriia (17 ± 1.2%) and Cyanobacteria (2.9 ± 0.52%). At the family taxonomic rank, Rhodobacteraceae (25 ± 1.5%), Flavobacteriaceae (16 ± 1.1%), Hyphomonadaceae (11 ± 1.3%), Flavobacteriaceae (9.9 ± 1.2%), SAR11 clade Surface 1 (6.3 ± 0.89%), and Halieaceae (6.0 ± 0.59%) comprised the majority of the total sequences (Figure VI-9). As for the first mesocosm experiment, Archaea represented less than 1% of the microbial community of all samples, and they were considered as rare taxa in the further analyses.

NMDS plot and PERMANOVA tests showed that the samples were clustered by both sampling times and conditions (Figure VI-10 and Table E- 7A). At all taxonomic rank, Cu addition (PERMANOVA, R^2 = 0.58; P < 0.001) showed a greater influence on community variations than time (PERMANOVA, R^2 = 0.14; P < 0.001) or interaction between time and experimental condition (PERMANOVA, R^2 = 0.20; P < 0.001) (Table E- 7B). Pairwise PERMANOVA showed that bacterial community structures were significantly similar between initial seawaters from LAZ and 6ext and significantly different to the initial seawater from 41p (Table E- 7B). At the beginning of the experiment (T0), similarly to what observed for 41p in the first experiment, the bacterial community structure, in each control conditions, was not significantly dissimilar than related Cu-treated ones (LAZ CTRL vs LAZ Cu, and 6ext CTRL vs 6ext Cu). After the 7th day, and until the end of the experiment, significant differences were clearly observed between Cu-treated and non-Cu-treated communities for 41p and LAZ. Conversely, pairwise comparisons showed no significant difference between 6ext CTRL and 6ext Cu, whatever the sampling time.

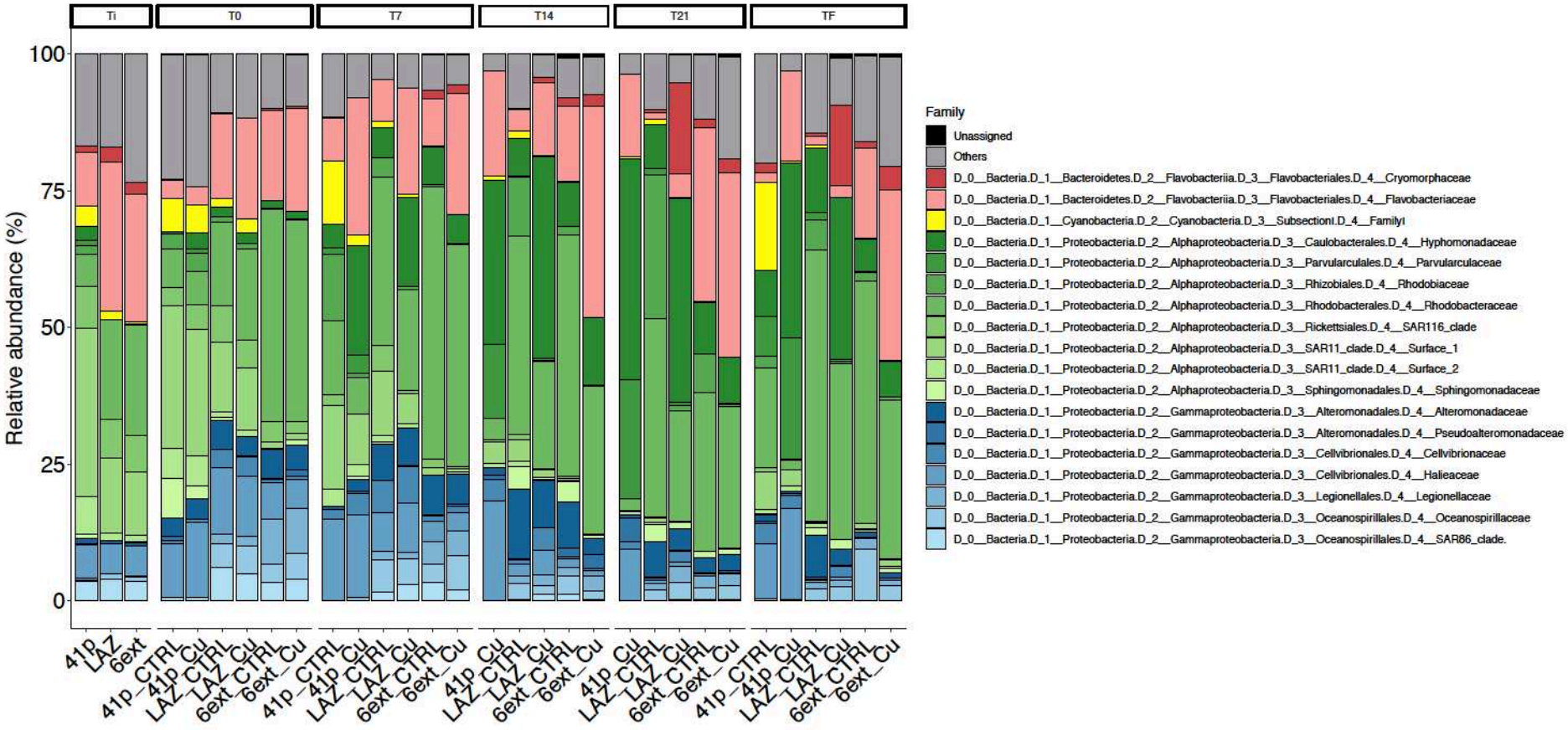


Figure VI-9 Composition of heterotrophic microbial community at the family level in initial seawaters and in the 6 conditions over the entire course of both control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. Families that on average comprised less than 1% of the libraries are grouped as “Others.”

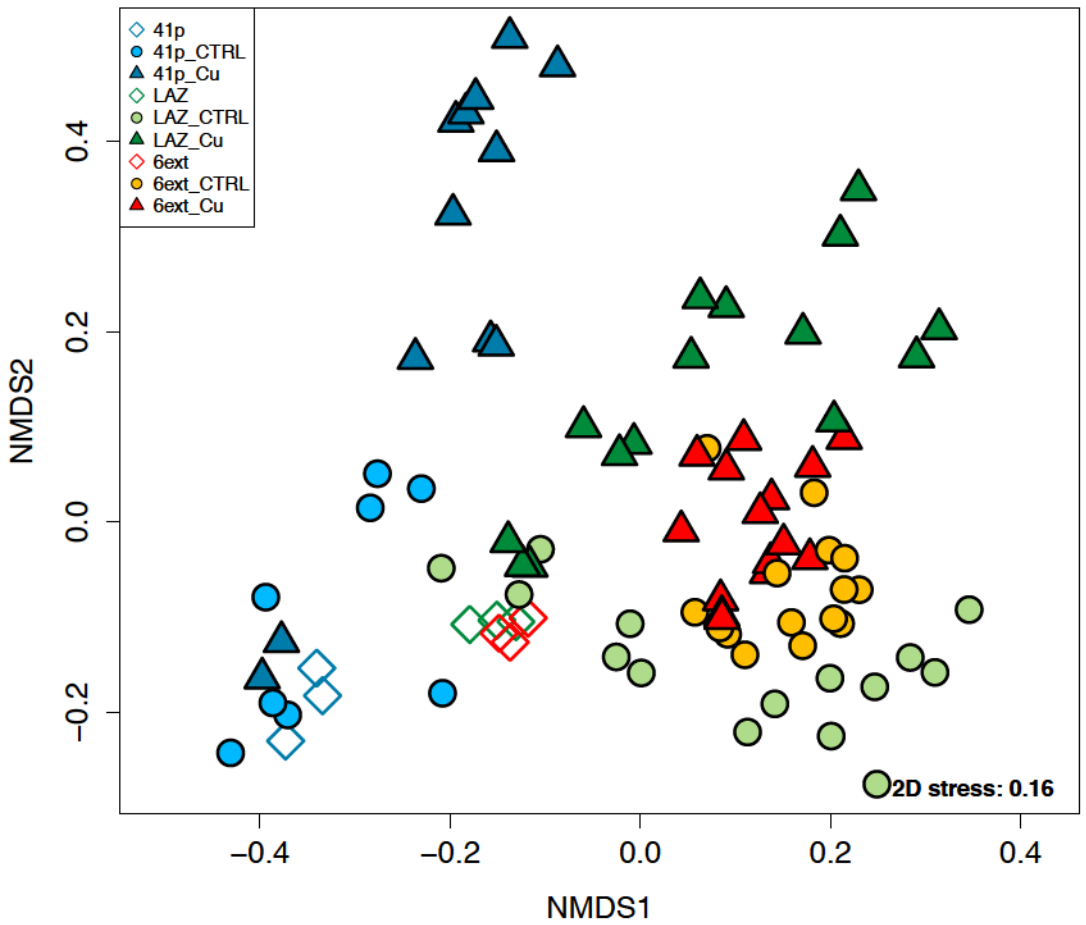


Figure VI-10 Non-metric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray–Curtis dissimilarity for 16S rRNA gene libraries between the different conditions of both control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments. Each symbol corresponds to a distinct condition, time and replicate. Empty symbols represent initial seawater samples.

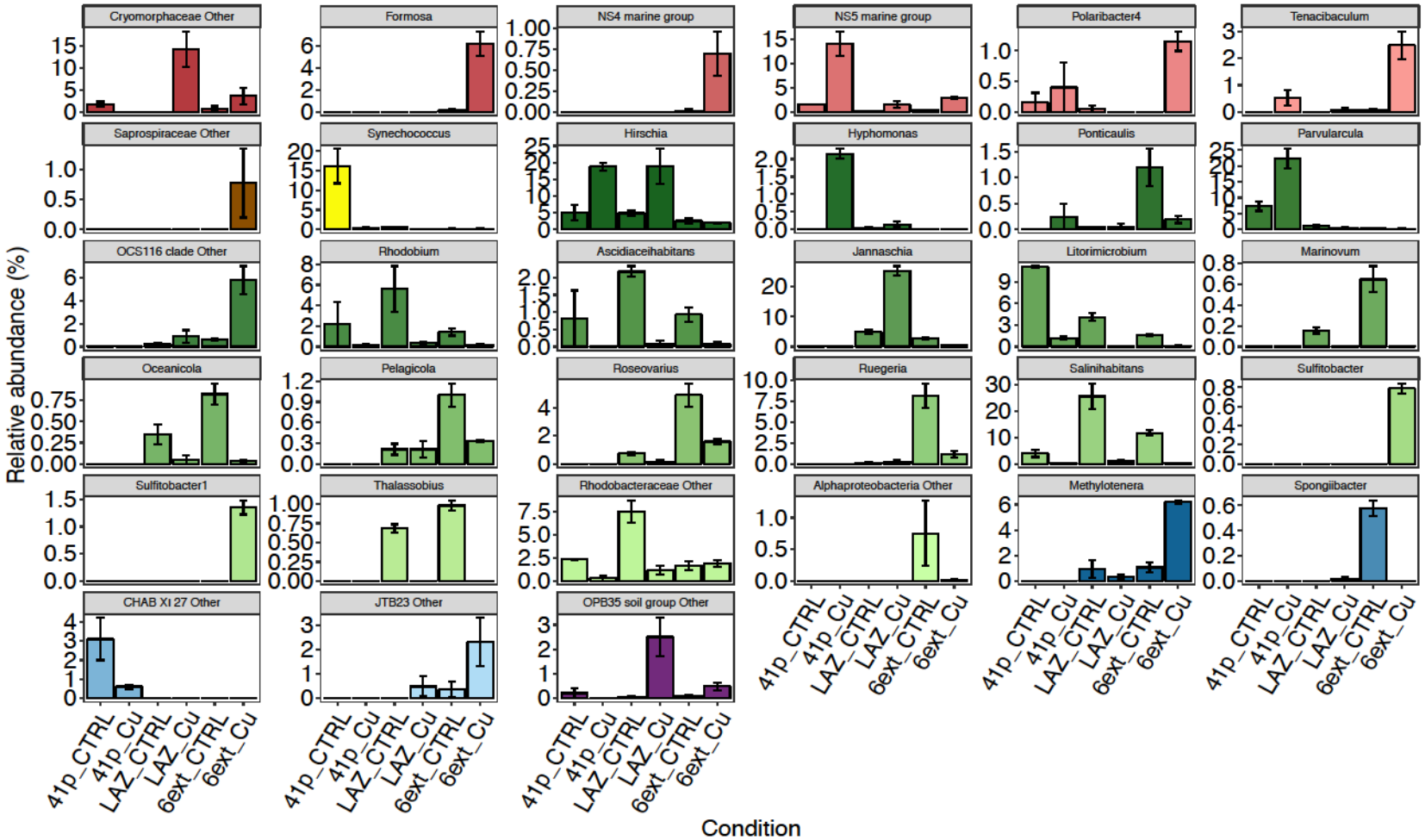


Figure VI-11 Relative abundance of genera found at week 5 (TF) in both control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments showing significant differences in abundance between conditions (SIMPER). Error bars represent the standard deviation (n = 3). Specific contribution (%) of particular genera to total dissimilarity between prokaryotic communities of two conditions using SIMPER is detailed in Table E- 9.

VI.2.3.5.2. Representative taxa responsible for structural changes over the duration of the experiment

SIMPER analyses revealed that within the abundant families, 12 representative families were significantly discriminating initial seawaters, and also control and Cu-treated conditions across experiment duration (Table E- 8). This is in accordance with the relative abundances shown in Figure VI-9, where SAR11 clade Surface 1 and Surface 2, Hyphomonadaceae, and Family I (Cyanobacteria) were higher in 41p than in LAZ and 6ext, while Flavobacteriaceae and Rhodobacteraceae were more abundant in LAZ and 6ext than in 41p (Table E- 8). Finally, major differences between LAZ CTRL and LAZ Cu were explained by the variation of relative abundances of Hyphomonadaceae, Rhodobiaceae, Cryomorphaceae and Alteromonadaceae.

At a lower taxonomic rank, among the 176 genera recorded, 34 were significantly discriminating control and Cu-treated conditions at the end of the experiment (TF) (Figure VI-11 and Table E- 9). *Salinihabitans* and *Rhodobium* decreased in LAZ Cu compared to LAZ CTRL while *Jannaschia*, *Cryomorphaceae Other*, and *Hirschia* increased in LAZ Cu compared to LAZ CTRL. *Ruegeria* decreased in 6ext Cu compared to 6ext CTRL while *Formosa*, OCS116 clade, and *Methylotenera* increased in 6ext Cu compare to 6ext CTRL. Finally, representative genera responsible for structural change between control conditions and Cu-treated conditions for 41p and LAZ were mainly abundant genera while for 6ext, representative genera were mainly rare genera.

VI.2.4. Discussion

VI.2.4.1. Copper exposure induce changes in bacterioplankton communities

In both mesocosm experiments, temporal variations in bacterioplankton community structure were observed regardless of metal additions. However, metal addition exhibited a stronger influence on community structure than the experimental setup or the experiment time did. Cu addition seemed to cause an increase in bacterioplankton abundance and in some alpha diversity metrics, as well as important changes in community structure. One way to explain these observations relies in the intermediate disturbance hypothesis (IDH), which predicts the highest diversity for disturbance of intermediate frequency and intensity (Connell, 1978).

Actually, high bacterioplankton abundance and diversity seem to be common features of marine microbial communities in many polluted environments (Nogales *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015), along with community turnover linked to the disappearance of certain groups and the proliferation of rare taxa resistant to corresponding stresses (Gillan *et al.*, 2005; Nogales *et al.*, 2011).

Copper exposure killed more than 99% of the phytoplanktonic community. The fresh and labile organic matter released by this cell lysis could have created new ecological niches, allowing the proliferation of the total community and the growth of initially rare species. Thus, the strong interdependence between bacterioplankton and phytoplankton communities could partly explain Cu-specific responses of microbial communities (Kent *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014) The selective pressure of metals on phytoplankton and more precisely on ultraphytoplankton is now well documented (Echeveste *et al.*, 2012; Lafabrie *et al.*, 2013; Coclet *et al.*, 2018) and several demonstrations of the consequences of a high phytoplanktonic mortality for bacterioplankton dynamics have been reported (Pinhassi *et al.*, 2004; Kent *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014; Goni-Urriza *et al.*, 2018).

Additionally, when considering the widely reported bacterial metal resistance (Nies, 1999; Baker-Austin *et al.*, 2006), the response of the bacterial community to Cu addition might also be due to the proliferation rate of resistant taxa, which can be higher than the extinction rate of sensitive taxa (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017).

Although a temporal variability in the bacterial community was observed during both mesocosm experiments, we found Cu-induced patterns of community at each sampling time from day 7, meaning that temporal variability did not mask the selective pressure of Cu on bacterioplankton community composition. Several families were significantly affected by the community turnover in Cu-treated conditions. Among these families, Hyphomonadaceae, Flavobacteriaceae, and Halieaceae, including members of the genera *Hirschia*, *Hyphomonas*, *Maricaulis*, NS5 marine group, OM60(NOR5) clade, *Jannaschia*, and *Cryomorphaceae* were the most significantly discriminating ones between controls and Cu-treated conditions. Particularly, *Hirschia* (Hyphomonadaceae) increased in Cu-treated conditions for both mesocosm experiments, indicating that they could be more resistant or take advantage to copper addition. Hyphomonadaceae were known to be abundant in plastic-attached biofilm communities (Zettler *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2016; De Tender, Devriese, *et al.*, 2017; Oberbeckmann *et al.*, 2018), especially in disturbed environments (Briand *et al.*, 2017; Coclet

et al. Submitted). However, it is from our knowledge the first observation of significant presence of this group in metal contaminated seawater. Flavobacteriacea was also a major component of the bacterial community in strongly disturbed and metal-contaminated environments (Allen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Zouch *et al.*, 2018; Coclet *et al.*, 2019). In Cu containing conditions, significant increases in the relative abundance of these taxa suggested an ability of these microorganisms to take advantage of the presence of Cu and outcompete other microorganisms. Conversely, members of Rhodobacteraceae, Family I (Cyanobacteria, mainly *Synechococcus*), Alteromonadaceae, and SAR11 Surface 1 families decreased in Cu-treated conditions, in accordance with previous reports where these families were sensitive to metal contamination. For a majority of them, they appeared sensitive to high *in situ* trace metal levels (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014; Coclet *et al.*, 2018, 2019) or characteristic of marine zones away from anthropogenic influence (Gilbert *et al.*, 2009, 2012; Fuhrman *et al.*, 2015). Our study points out their sensitivity to Cu contamination representative from a harbor, although the direct (*i.e.* toxicity) or indirect (*i.e.* related to phytoplankton decay) processes involved remain to be determined. Finally, copper sensitivity's differences of bacterioplanktonic communities could be the result of their metal exposure history in the natural environment, especially in a dynamic system such Toulon Bay where microorganism could be dispersed and mixed by currents.

VI.2.4.2. Responses of bacterioplankton communities to Cu contamination according to their exposure history

Trace metal contamination gradients in Toulon bay have been already described by punctual mappings (Jean *et al.*, 2012; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Coclet *et al.*, 2018) or during short (Coclet *et al.*, 2019) or long-term surveys (Layglon *et al.*, *Submitted*). Taken together, these studies demonstrated that TME contamination gradient persists at a pluri-annual scale in Toulon Bay. Its amplitude and distributions depend on contamination sources and TME transfers with the biota and the sediments. Although hard to model in the most enclosed parts, hydrodynamics is also supposed to play a major role in TME export (Mazoyer, 2019). All these processes suggest variations in metal contaminant exposure (from acute to chronic) for microorganisms along metal contaminant gradients. The 3 sampling seawaters used for mesocosm experiments were geochemically contrasted. They were representative of the

North-West to South-East decreasing contamination gradient of trace metal contaminants (mainly Cu and Pb) initially observed in Toulon Bay, with a minimal contamination recorded in the site opened on the sea (41p) and a maximal contamination recorded in the northern and enclosed part of the little bay (6ext) where the TME contamination is chronicle (Layglon *et al.*, *Submitted*).

On one hand, we observed that Cu addition in low (41p) and in intermediately (LAZ) contaminated seawaters induced important changes in composition of bacterioplankton communities at each sampling time from day 7. We hypothesize that similar responses, including mechanisms of toxicity and resistance to Cu, occurred with both communities. However, if the two same families (*i.e.* Hyphomonadaceae and Rhodobacteraceae) were the major contributors of the variations observed in composition between control and Cu-treated conditions, we found that main genera contributing to variations in composition between control and Cu-treated conditions were dissimilar for the two communities. This observation could be the result of differences in initial community composition in 41p and LAZ seawaters.

On the other hand, Cu addition in seawater originating from a chronically contaminated site (6ext) only weakly impacted the bacterioplankton community structure. The greatest differences in community structure induced by Cu addition were not observed at the family level but at the genus level and they were mainly observed for rare bacterial genera of the natural bacterial assemblage. For example, *Tenacibaculum*, *Ruegeria*, *Formosa*, OCS116 clade, and *Methylotenera* became more abundant after the Cu addition. Such increase of rare bacteria in response to environmental disturbance had already been described (Atlas *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 2011, 2015; Campbell and Kirchman, 2012; Lindh *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2018). This is in agreement with the replacement scenario (Comte and Del Giorgio, 2011), and previous findings showing that the rare biosphere is an important reservoir for the recruitment of bacterial taxa during environmental disturbance (Sjöstedt *et al.*, 2018). Additionally, contributor genera in 6ext Cu-treated waters were exclusive and didn't prove to be significant contributors to the variation of composition when copper was added in 41p and LAZ seawaters. Thus, this confirms that variations of responses that we observed could be the result of differences in initial community composition with the presence of a higher proportion of tolerant species consequently to a longer metal-exposure history for the community sampled in the most contaminated site (Carman *et al.*, 2000). Considering the rather short residence time of the water evaluated in Toulon Bay (1-7 days) (Dufresne *et al.*, 2014), even if

this estimation is probably not representative from very enclosed parts such as where is located our sampling site 6ext, our observation highlights the ability of marine bacterioplankton to quickly adapts to Cu contamination in harbor. The previous observation of *Tenacibaculum* and *Formosa* genera, positively selected in Cu-amended 6ext water, as abundant and representative taxa from 6ext site during a one-month-long survey is in agreement with this hypothesis (Coclet *et al.*, 2019).

VI.2.4.3. Limited effects of Pb contamination on bacterioplankton communities

In our study, the effect of Pb addition on bacterial communities was actually less pronounced than the effect observed due to Cu addition. Pb addition appeared to have little impact on bacterioplankton alpha diversity indices or community structure and no detectable effect on ultraphytoplankton. Moreover, similar effects between Cu addition alone and co-addition of Cu and Pb were observed on bacterioplankton abundance and structure, which confirmed the hypothesis that Pb exposure had limited impacts on bacterioplankton communities compared to Cu exposure in our experimental conditions. The weak toxicity of Pb on bacteria could be explain by their resistance and detoxification mechanisms against Pb toxicity, which are very efficient (Trevors, 1989; Nies, 1999; Nayar *et al.*, 2004), especially against Pb toxicity (Naik and Dubey, 2013). Additionally, the dichotomy between Cu and Pb effects could be due to the difference in metal concentrations added in our mesocosm. Indeed, Pb concentrations were 20-fold lower than Cu concentrations, thus reducing the dose at which the cells were exposed. No data is available in the literature concerning tolerance threshold of marine bacterial communities against Pb contamination. However, for instance, cadmium has been described to have no effect on bacterial diversity at intermediate concentration (*i.e.* 90 nM), while negative effects were shown under high concentrations (*i.e.* 10 µM) (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017).

Genera *Glaciecola* and *Erythrobacter* were responsible for the few structural changes in Pb-treated condition. The relative abundance of *Glaciecola* taxon significantly increased while *Erythrobacter* became undetectable when only Pb was added. *Glaciecola* has been described to be a non-abundant member of bacterioplankton communities, but their abundance can rapidly increase following the input of DOC concentrations (Sipler *et al.*, 2017; von Scheibner *et al.*, 2017). Thus, since DOC concentrations in our experiment were similar in

all conditions, the ability of *Glaciecola* to take advantage compared to other taxa in a metal contaminated ecosystem remained unexplained. The genus *Erythrobacter* was found to be important taxa in surface-attached communities (Zettler *et al.*, 2013; Dussud *et al.*, 2018; Oberbeckmann *et al.*, 2018), and notably in contaminated ecosystems (Briand *et al.*, 2017; Pollet *et al.*, 2018; Catão *et al. submitted*; Coclet *et al.*, *Submitted*). Thus, the strong decrease of *Erythrobacter* in the seawater when Pb was added could be explained by the ability of these groups to form biofilm in chemically contaminated conditions. Indeed, biofilms are one of the most widely distributed and successful mode of life in water environment (Stoodley *et al.*, 2002; Flemming *et al.*, 2016) and a strategy that microorganisms might use to protect them from toxic metals (Harrison *et al.*, 2007).

VI.2.5. Conclusion

In conclusion, from our mesocosm experiences, we can conclude that copper exposure affected abundance, diversity and composition of bacterioplankton from both very few and intermediately TME contaminated seawaters. The effect of Cu addition was mainly visible on the relative abundance of Hyphomonadaceae, Flavobacteriaceae, and Halieaceae families. Particularly, we report for the first time the increase of *Hirschia* (Hyphomonadaceae) relative abundance in high level of Cu concentrations. Additionally, we demonstrated that rather short-term TME exposure history had strong influence on the response of bacterioplankton to a new contamination. Bacterioplankton communities from the contaminated site were less impacted by Cu exposure than communities from very low or intermediately contaminated sites. Additionally, we showed that changes in bacterioplankton communities from contaminated sites were mainly due to rare taxa as *Tenacibaculum*, *Ruegeria*, *Formosa*, OCS116 clade, and *Methylotenera*. Thus, chronic contamination of the seawater can lead to a rapid adaptation of communities, related to changes in species composition and the selection of metal-resistant taxa, when a new metal contamination occurred. Finally, we showed limited impacts of Pb exposure compared to Cu contamination, probably due to the low toxic potential against bacterioplankton and the efficiency of their resistance and detoxification mechanisms. Taken together, these results showed stronger influence of Cu contamination than Pb contamination for bacterioplankton communities. However, even in a simplify system

as mesocosms we can't conclude about direct and indirect effects of TME contaminations due to the complexity of both biotic and abiotic interactions.

Acknowledgements

This study was supported by IMPRECI-M^2 research program (funded by EC2CO). C. Coclet PhD was funded by the Provence-Alpes-Côte d'Azur region and supported by TPM. The authors wish to thank the French Navy and the LASEM for diving and sampling assistance, C. Martino for building assistance of mesocosm structure (Toulon University, France) for sampling and sample treatment assistance. The authors declare that they have no conflict of interest.

VI.3. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'impact spécifique d'une contamination en Cu et en Pb sur l'abondance et la composition des communautés de bactérioplancton provenant d'un site très peu contaminé a été étudié. L'influence de l'historique de contamination sur l'effet d'une nouvelle contamination en Cu a ensuite été examinée. Cette étude est basée sur la réalisation de deux mésocosmes en laboratoire et l'analyse des communautés de procaryotes par la cytométrie en flux et la technique de séquençage haut débit Illumina Miseq.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence l'influence importante d'une contamination en ETMs sur les communautés de bactérioplancton. Ainsi, l'ajout de Cu a semblé induire une augmentation de l'abondance et de la diversité des communautés de procaryotes. La contamination en Cu a aussi entrainé la diminution de près de 99% de la biomasse ultraphytoplanctonique dans la colonne d'eau. L'ajout de Cu dans une eau d'ordinaire très peu contaminée a entrainé un changement de composition important après seulement quelques jours d'expérience. Certaines familles comme Rhodobacteraceae, Family I (Cyanobacteria, principalement *Synechococcus*), Alteromonadaceae et SAR11 Surface 1 sont apparues très sensibles à la contamination en Cu. En revanche, les familles telles que Hyphomonadaceae, Flavobacteriaceae et Halieaceae sont devenues abondantes et ont donc montré des capacités de résistance plus importantes que les autres familles. Les observations faites durant cette expérimentation sont en accord avec les résultats précédemment présentés dans la rade de Toulon et elles permettent de confirmer l'effet structurant des ETMs sur les communautés de bactérioplancton. Les processus directs (toxicité) ou indirects (lié à la mortalité du phytoplancton) sont deux hypothèses pour expliquer la sensibilité au Cu des communautés de bactérioplancton provenant d'une eau très peu contaminée. Toutefois, cette expérimentation ne permet pas déterminer l'importance de l'une et l'autre de ces hypothèses.

La deuxième expérience en mésocosme réalisée lors de cette étude, a permis de mettre en évidence l'importance de l'historique de contamination des communautés de bactérioplancton de la rade de Toulon pour expliquer l'effet d'une nouvelle contamination. Les changements de composition liés à l'ajout de Cu ont été très importants pour des communautés des zones peu contaminées ou contaminées de façon intermédiaire. En revanche, l'ajout de Cu a eu un effet relativement peu marqué sur la composition des

communautés de bactérioplancton des zones très contaminées de la rade de Toulon. De plus, les changements de composition des communautés provenant des sites très contaminés étaient principalement liés aux taxa considérés comme rares. Ainsi, une contamination chronique de la colonne d'eau a pu favoriser une adaptation rapide des communautés face à une nouvelle perturbation, notamment par la sélection de taxa résistants aux ETMs.

Enfin, cette expérience a apporté une information supplémentaire quant à l'influence respective de certains ETMs. Ainsi, le Cu a eu une influence plus importante que le Pb sur les communautés de bactérioplancton provenant d'un site très peu contaminé. En effet, l'ajout de Pb seul n'a pas entrainé de changement de composition des communautés par rapport au contrôle et l'ajout d'un mélange Cu-Pb n'a pas montré d'effet additionnel, synergique ou antagoniste en comparaison à l'ajout de Cu seul. Ces résultats ont permis de montrer que le Pb a eu une influence limitée sur les communautés de bactérioplancton en conditions contrôlées. Ceci est probablement due au potentiel toxique plus important du Cu et à des mécanismes de résistances des microorganismes plus efficaces face à une contamination au Pb qu'au Cu. Le Cu et le Pb ont été choisis pour cette étude car ce sont les deux principaux ETMs retrouvés dans la rade de Toulon et ce sont les gradients les plus forts entre les zones peu contaminées et les zones très contaminées. Toutefois, la contamination en ETMs multiple de la colonne d'eau de la rade de Toulon pousse à tester l'influence respective d'autres ETMs seul ou leur interaction avec le Cu ou le Pb. Enfin, dans la continuité des résultats obtenus au cours de cette thèse, il apparait nécessaire d'étudier l'importance de l'historique d'exposition aux contaminants sur la formation et l'établissement d'un biofilm microbien dans le contexte d'une nouvelle contamination.

CHAPITRE VII. DISCUSSION GÉNÉRALE

VII.1. Rappel des objectifs et des approches utilisées

Dans un contexte général de forte anthropisation des zones côtières, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments relatifs à l'impact d'une multicontamination en ETMs sur des communautés microbiennes. Le gradient multiple de contamination en ETMs très marqué et l'apparente stabilité des autres variables environnementales ont fait de la rade de Toulon un formidable site atelier. Malgré ces caractéristiques remarquables, seules quelques études ont évalué l'influence des ETMs sur les communautés microbiennes dans la rade de Toulon (Misson *et al.*, 2016; Briand *et al.*, 2017; Catão *et al. Submitted*). Cette thèse a permis d'apporter des précisions quant aux réponses des communautés microbiennes planctoniques et en biofilm.

Le premier objectif de ce travail de thèse était de caractériser l'impact d'une contamination multiple en ETMs sur l'abondance et la structure d'une communauté ultraphytoplanctonique et sur l'abondance d'une communauté de procaryotes. Le second objectif consistait à étudier l'impact d'une contamination métallique sur l'abondance, la diversité et les fonctions des communautés de procaryotes hétérotrophes et autotrophes planctoniques. Le troisième objectif visait à étudier l'influence de la contamination multiple en ETMs sur la densité et la diversité des communautés de procaryotes dans les biofilms. Cette étude a permis de comparer les réponses des communautés face à une contamination en ETMs selon leur mode de vie (*i.e.* planctonique vs biofilm). Enfin, le dernier objectif visait à étudier l'influence d'une contamination en Cu et/ou en Pb sur des communautés microbiennes ayant différents historiques d'exposition aux ETMs.

Pour répondre aux objectifs définis durant cette thèse, plusieurs campagnes de terrain (*i.e.* suivi à long-terme, campagne à haute fréquence spatiale ou suivi hebdomadaire durant un mois) et expérimentations en laboratoire (*i.e.* microcosmes et mésocosmes) ont été réalisées. Ces deux approches complémentaires, la pluridisciplinarité des techniques d'analyses (*i.e.* chimie analytique, cytométrie en flux et biologie moléculaire) et des modes de vie étudiées (*i.e.* planctonique et biofilm) ont apporté un ensemble d'éléments nouveaux vis-à-vis de l'écologie des communautés microbiennes en milieu marin côtier fortement anthropisé.

Cette discussion générale de thèse s'articule autour de quatre parties. Dans la première, les avantages et les limites des différentes approches sont décrits et l'avantage du couplage des deux approches méthodologiques est présenté. La deuxième partie propose une discussion transversale sur les résultats présentés dans les différents chapitres de cette thèse afin de comparer la réponse des communautés aux ETMs selon le compartiment. La troisième partie discute de l'influence des paramètres environnementaux autres que les ETMs sur les communautés microbiennes. Enfin, la quatrième et dernière partie fait un focus sur *Synechococcus*, un taxon emblématique dans cette étude car il a particulièrement bien répondu aux conditions environnementales ou expérimentales durant cette thèse.

VII.2. Avantages et limites du couplage des analyses de cytométrie en flux et du séquençage haut débit

VII.2.1. Avantages de la cytométrie en flux

Au cours de cette thèse, la cytométrie en flux a été utilisée pour déterminer l'abondance des communautés ultraplanctoniques et la densité des communautés microbiennes dans les biofilms. La cytométrie en flux est apparue comme un outil facile d'utilisation, permettant de fournir des résultats rapidement et à moindre coût. Cet outil permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps ; de l'ordre d'une minute par échantillon pour les procaryotes hétérotrophes et moins de 10 minutes par échantillon pour les communautés autotrophes. La cytométrie en flux a aussi permis d'étudier l'abondance de différents groupes selon leurs propriétés (cellules de différentes tailles, plus ou moins complexes, autofluorescentes ou pas, contenant différents types de pigments photosynthétiques). Ainsi, à partir d'un seul échantillon, l'abondance de plusieurs groupes « fonctionnels », *i.e.* procaryotes hétérotrophes, procaryotes autotrophes, picoeucaryotes autotrophes, nanoeucaryotes autotrophes a pu être déterminée (*e.g.* Davey and Kell, 1996; Gasol *et al.*, 2000; Nebe-Von-Caron *et al.*, 2000; Veldhuis and Kraay, 2000).

La cytométrie en flux constitue une technique avantageuse par rapport à la qPCR qui a aussi été utilisée durant cette thèse, et qui ne permet d'étudier aisément que l'abondance d'un seul groupe à la fois. En effet, l'utilisation de la qPCR nécessite différentes amorces pour amplifier une partie du gène codant pour l'ADNr 16S (procaryotes) ou 18S (eucaryotes). La

qPCR pour la quantification des eucaryotes reste à ce jour très peu utilisée car le nombre de copies du gène 18S par cellules est très variable selon les taxa (Zhu *et al.*, 2005). Zhu *et al.* (2005) ont déterminé que le nombre de copies d'ADNr 18S variait entre 1 et 12000 pour 18 taxa de phytoplancton (Figure VII-1). La quantification précise du nombre de cellules eucaryotes dans un échantillon devient alors difficile. Au cours de cette thèse, la cytométrie en flux a permis de déterminer précisément la quantité de cellules eucaryotes dans un échantillon d'eau et de les trier par classes de taille et/ou par pigments photosynthétiques (Figure VII-2). Ainsi, la cytométrie en flux a permis de mettre en évidence des gradients d'abondance de certains groupes ultraphytoplanctoniques le long du gradient multiple de contamination en ETMs dans la rade de Toulon.

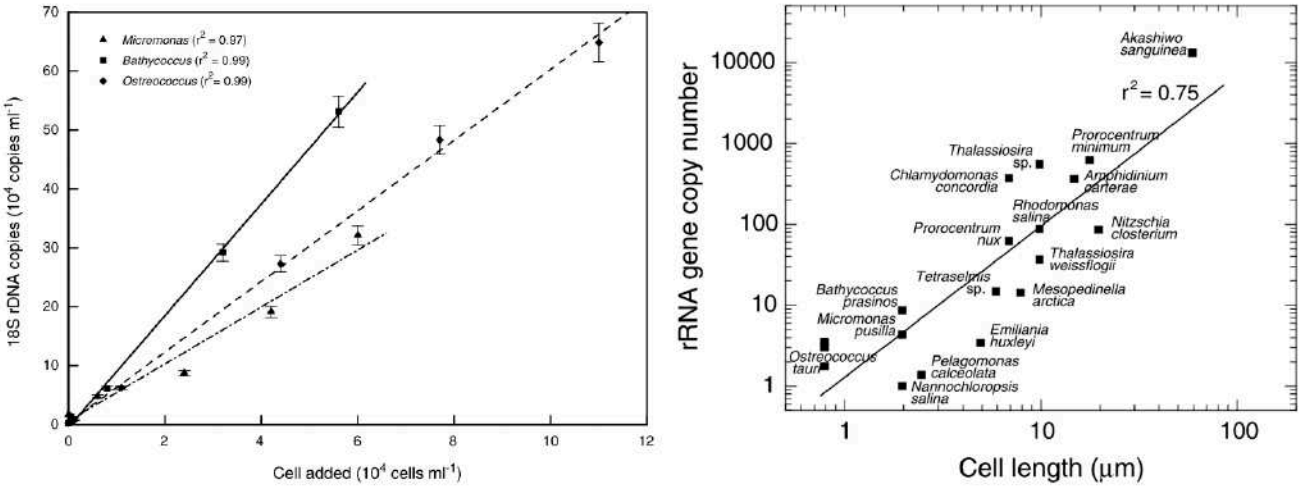


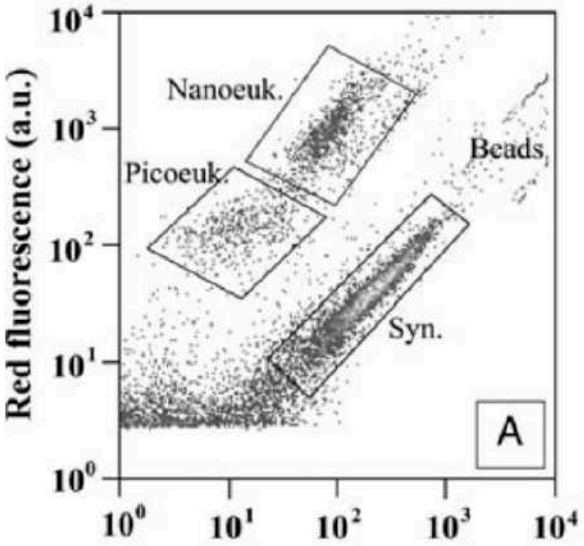
Figure VII-1 Relation entre le nombre de cellules ajoutées estimées par cytométrie en flux et le nombre de copies d'ADNr 18S mesurées par qPCR pour 3 taxa de picoeucaryotes (A) et relation entre la taille des cellulues (µm) et le nombre de copies de gène 18S dans une cellule en fonction des taxa (Zhu et al., 2005).

Enfin, la cytométrie en flux permet aussi d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure et l'état physiologique des cellules étudiées comme la quantité de pigments présents dans une cellule, l'état de viabilité d'une cellule ou d'une population, le biovolume et la taille moyenne des cellules d'une population par exemple. Toutes ces informations obtenues à partir d'une seule analyse peuvent être très utiles pour comprendre le rôle des ETMs à l'échelle des cellules ou des populations.

VII.2.2.Cas spécifique de la cytométrie en flux pour la mesure des densités cellulaires au sein des biofilms

Durant cette thèse, la cytométrie en flux a été utilisée pour caractériser la densité cellulaire des procaryotes hétérotrophes et autotrophes et des eucaryotes autotrophes au sein des biofilms naturels et complexes. Cette thèse fournit ainsi des renseignements complémentaires à des études réalisées par ailleurs dans la rade de Toulon sur la diversité des communautés microbiennes dans les biofilms (Briand *et al.*, 2017; Pollet *et al.*, 2018; Catão *et al. Submitted*). L'utilisation de la cytométrie pour l'analyse des biofilms est basée sur le même principe que pour les cellules planctoniques, à un détail près, qu'il est nécessaire avant l'analyse de séparer les cellules de la matrice extracellulaire. Cette étape de préparation peut induire des biais de mesure. Si le rendement d'extraction n'est pas efficace, la densité cellulaire peut être sous-estimée. Au contraire, si ce rendement est optimal, il peut remettre en suspension des composants du biofilm autres que les cellules et, par interférence avec le signal capté, entraîner une surestimation de la densité cellulaire. Le protocole de séparation des cellules a aussi rendu difficile l'interprétation des cytogrammes pour l'identification des populations autotrophes, en comparaison aux cytogrammes obtenus avec des échantillons d'eau (Figure VII-2).

D'autres techniques de dénombrement des cellules en biofilm existent, *i.e.* la microscopie électronique à balayage, la microscopie confocale à balayage laser et la microscopie à fluorescence (Faÿ *et al.*, 2011; Neu and Lawrence, 2015; De Tender, Schlundt, *et al.*, 2017). Toutefois, ces techniques sont très peu utilisées sur des biofilms naturels et complexes car le dénombrement des cellules est rendu difficile par la structure tridimensionnelle complexe du biofilm et le bruit de fond du microscope (Shikuma and Hadfield, 2010). Il apparait alors difficile d'évaluer l'efficacité de la cytométrie en flux par rapport aux autres techniques. La cytométrie en flux semble malgré tout la « meilleure » approche puisqu'elle est fiable, facile et rapide pour dénombrer les cellules dans les biofilms naturels et complexes. Enfin, cette technique semble reproductible car les mêmes ordres de grandeurs de densités de procaryotes hétérotrophes ont été mesurés sur le même substrat (PVC), à la même période et sur le même site mais provenant de différentes études (Camps *et al.*, 2014; Briand *et al.*, 2017; Pollet *et al.*, 2018).



B

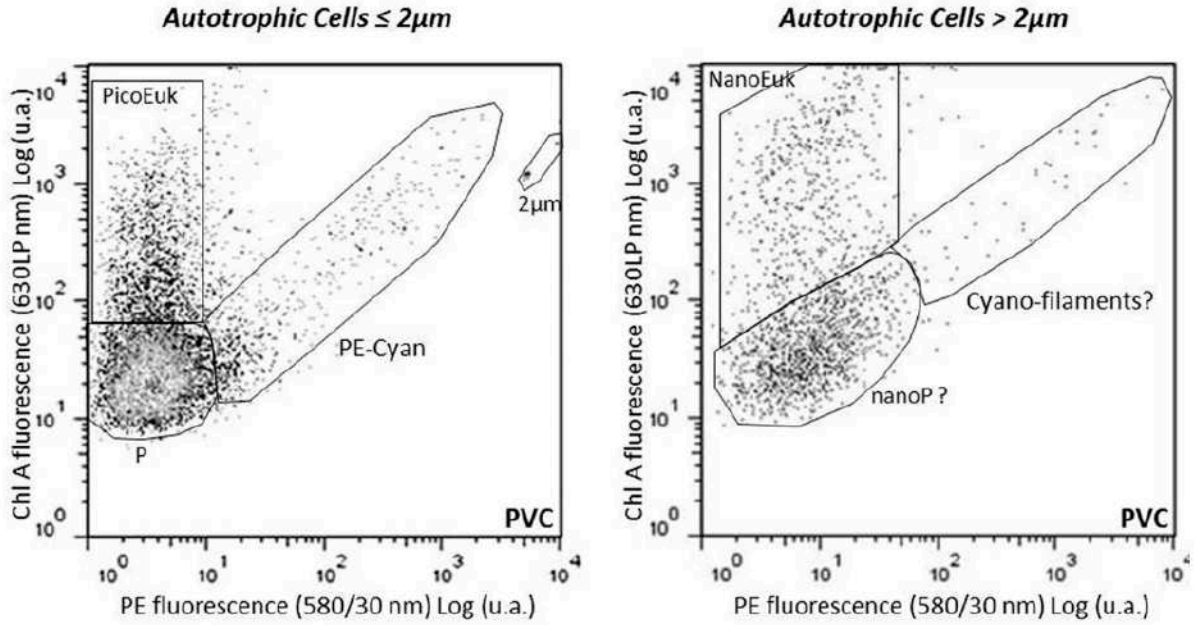


Figure VII-2 Cytogrammes d'un échantillon d'eau (A) et d'un échantillon de biofilm (B) obtenus par cytométrie en flux pour l'analyse d'une communauté autotrophe. P pourrait représenter ici, des particules mises en suspension lors du protocole de séparation des cellules et ne représenterait alors pas des cellules du biofilm. La séparation entre le groupe P et la population PicoEuk est difficile à délimiter du fait de ce groupe P. De façon générale, les populations sont bien moins individualisées lors de l'analyse des biofilms que lors de l'analyse d'échantillons d'eau. D'après Zhao et al. (2012) et Camps et al. (2014).

VII.2.3.Limites de la cytométrie en flux

Comme présenté précédemment, l'analyse en cytométrie en flux ne permet pas une caractérisation taxonomique résolutive des populations planctoniques et de biofilms. Les *Prochlorococcus*-like ont été pris en compte seulement lors des campagnes de terrain à haute fréquence spatiale en 2014 et 2015. La détection de ce groupe étant trop souvent rendue difficile et approximative par sa proximité avec le bruit de fond du cytomètre utilisé pour les mesures, ce groupe a été exclu des analyses suivantes dans lesquelles la mortalité du phytoplancton en réponse à l'ajout d'ETM biaisait encore davantage l'identification de ce groupe. L'utilisation de la cytométrie en flux implique une limite supérieure de taille au-dessus de laquelle les cellules libres ou attachées à une particule ne sont plus dénombrées (seuil environ à 30-40 µm pour le cytomètre utilisé au cours de cette thèse). Dans la rade de Toulon, où la charge en particules de la colonne d'eau est importante, l'utilisation de la cytométrie en flux peut entraîner une sous-estimation de l'abondance réelle des communautés microbiennes et conduire à une interprétation incomplète de la structure des communautés le long du gradient multiple de contamination. Toutefois, malgré des imperfections, l'utilisation de la cytométrie en flux au cours de cette thèse a été très avantageux dans le sens où elle a permis de mettre en évidence des gradients d'abondance de plusieurs groupes ultraphytoplanctoniques et de révéler des variations de sensibilité aux ETMs entre les groupes. Enfin, les études utilisant la cytométrie en flux réalisées au début de ce travail de thèse ont permis de donner une direction de travail et un fil conducteur durant toute la période de cette thèse.

VII.2.4.Avantage du couplage de la cytométrie en flux avec le séquençage haut débit (métabarcoding)

La cytométrie en flux ne donne aucune indication sur la diversité taxonomique des procaryotes hétérotrophes. Au mieux, elle permet de distinguer deux groupes selon la quantité d'ADN dans la cellule (High nucleic acid et Low nucleic acid). L'utilisation conjointe de la cytométrie en flux et du métabarcoding pour caractériser la diversité taxonomique des communautés microbiennes est alors apparue nécessaire dans le cadre de cette thèse. Le métabarcoding a permis d'étudier les variations de diversité le long du gradient multiple de

contamination dans la rade de Toulon. La diversité des biofilms prélevées lors des campagnes était significativement plus élevée que celle des échantillons d'eau. Le nombre moyen d'OTUs observés dans les biofilms était de 1500 OTUs quel que soit le site, alors qu'à peine 500 OTUs en moyenne ont été observés dans les échantillons d'eau. Bien qu'une diversité plus élevée dans les biofilms que dans l'eau ait déjà été observée par ailleurs (Zettler *et al.*, 2013), la question du volume d'eau de mer filtré pour analyser la communauté bactérioplanctonique peut se poser. En effet, durant cette thèse, 1 L d'eau de mer a été collectée pour l'extraction d'ADN quand de nombreuses études utilisent plusieurs litres d'eau (*e.g.* Zhang *et al.*, 2009; Gifford *et al.*, 2014; Jeffries *et al.*, 2016). Malgré cela, au regard des courbes de raréfaction des échantillons d'eau qui ont atteint un plateau, au même titre que les échantillons de biofilm et de la comparaison avec la diversité de communautés de bactérioplancton d'environnements perturbés (Meziti *et al.*, 2016; Fang *et al.*, 2017; Luria *et al.*, 2017; Zouch *et al.*, 2018), il semble que les analyses de séquençage de l'ADNr 16S aient été représentatives des variations réelles entre les échantillons d'eau et de biofilms. Cette approche moléculaire sur l'ensemble de la communauté de bactérioplancton (dit en bulk) n'a toutefois pas permis de distinguer les cellules planctoniques libres et attachées, au même titre que pour la cytométrie en flux. Il conviendrait alors de prendre en compte différentes fractions de taille pour les futures analyses moléculaires, car elles ne montrent généralement pas les mêmes tendances en termes de diversité en réponse aux variables environnementales (Zhang *et al.*, 2007; Ghiglione *et al.*, 2009; Michotey *et al.*, 2012; Crespo *et al.*, 2013; Ortega-Retuerta *et al.*, 2013; Bachmann *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

En plus de fixer des classes de taille, le choix des amorces utilisées pour l'analyse des communautés microbiennes via le séquençage haut débit de l'ADNr 16S peut grandement influencer les résultats d'une étude. Durant cette thèse, le couple d'amorces 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGG TAA) et 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT) a été utilisé (Parada *et al.*, 2016). Ce couple d'amorces a été évalué comme donnant des estimations plus précises des abondances relatives d'une communauté simulée et connue. La composition de cette communauté connue obtenue avec ces amorces a été très proche de la composition réelle de la communauté (R^2 = 0.95) en comparaison d'autres amorces connues pour sur- ou sous-estimer certains groupes taxonomiques (R^2 = 0.53) (Parada *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que selon Parada *et al.* (2016), l'utilisation de ces amorces a permis de mieux identifier les séquences d'archées au sein de la communauté microbienne.

VII.2.5.Limites du séquençage haut débit et approches futures

Dans le cadre de cette thèse, malgré l'utilisation de ces amorces, très peu de séquences d'archées ont été identifiées dans les communautés microbiennes planctoniques et de biofilms de la rade de Toulon. Cette thèse n'a pas permis de mettre en évidence l'effet des ETM sur ces microorganismes dans la rade de Toulon. Pourtant, les connaissances récentes sur les capacités de survie et de prolifération des archées dans des environnements divers ainsi que leur capacité à assurer des fonctions écologiques majeures (*i.e.* dégradation des hydrocarbures, méthanogénèse et réduction des sulfates) en milieux côtiers (Hugoni *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2018) et/ou contaminés (Yan *et al.*, 2018) poussent à améliorer la détection de ce groupe au sein des communautés de procaryotes. Ainsi, l'utilisation d'amorces spécifiques des archées aurait pu permettre une caractérisation plus juste de ce groupe dans la communauté (Massana *et al.*, 2000; Hugoni *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016; Compte-port *et al.*, 2018) et donc une meilleure compréhension de ce groupe vis-à-vis d'une contamination métallique dans la rade de Toulon.

Dans le même sens, le temps de préparation des échantillons, le coût d'analyse, le temps de séquençage puis de traitement des résultats n'ont pas rendu possible l'étude de la diversité taxonomique des communautés eucaryotes autotrophes durant cette thèse. L'ensemble des résultats acquis au cours de cette étude tendent à confirmer l'importance des picoeucaryotes au sein de la rade de Toulon. Par les variations d'abondance le long du gradient multiple de contamination en ETMs mises en évidence par cytométrie en flux d'une part, puis par l'influence des relations bactérioplancton-ultraphytoplancton pour expliquer en partie l'effet des ETMs sur la communauté de bactérioplancton dans la rade de Toulon d'autre part. Il apparait nécessaire de réaliser une analyse de séquençage de l'ADNr 18S pour étudier la dynamique de la communauté ultraphytoplanctonique le long des gradients métalliques et pour mieux comprendre les relations entre ces deux communautés ultraplanctoniques.

En résumé, le couplage de la cytométrie en flux et des outils moléculaires a permis d'observer des gradients d'abondance de certains groupes ultraplanctoniques forts le long des gradients métalliques de la rade de Toulon. L'étude de la diversité taxonomique par des outils moléculaires a alors permis de mettre en évidence des groupes procaryotes très représentés dans les zones contaminées alors que d'autres devenaient minoritaires. Les résultats des deux approches ont aussi permis d'identifier des relations entre les communautés

bactérioplanctoniques et ultraphytoplanctoniques pouvant influencer la dynamique de l'un ou l'autre des compartiments.

VII.3. Réponses des communautés microbiennes à une perturbation métallique selon le compartiment étudié : planctonique, biofilm et benthique

Cette thèse est la première étude à faire le lien entre les communautés planctoniques, de biofilms et benthiques le long d'un gradient multiple de contamination en ETMs dans la rade de Toulon. Cette comparaison a été rendu possible par l'étude du compartiment planctonique et de biofilm durant cette thèse, qui a complété des observations déjà disponibles (Briand *et al.*, 2012, 2017; Misson *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2018) ou en cours d'analyse (Catão *et al.Submitted*; Misson *et al. In prep*)

VII.3.1.Abondance et diversité des communautés microbiennes le long du gradient métallique

Les campagnes de terrain réalisées durant cette thèse ont montré que l'abondance des communautés microbiennes était similaire le long du gradient métallique dans la rade de Toulon, quel que soit le compartiment. En revanche, des variations de diversité le long du gradient métallique ont été observées. La richesse dans les biofilms n'a pas montré de tendance nette le long du gradient métallique. Dans l'eau, la richesse de la communauté de bactérioplancton était plus élevée dans les zones très peu contaminées que dans les zones très contaminées. A l'inverse, la richesse bactérienne dans les sédiments était plus élevée dans les zones du nord de la PR, très contaminées (Misson *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont montré que l'abondance et la diversité des communautés de procaryotes des sédiments (O'Sullivan *et al.*, 2013; Besaury *et al.*, 2014), des lacs (Gough and Stahl, 2011; Compte-port *et al.*, 2018) diminuaient dans les zones contaminées par rapport aux zones non contaminées. Ceci est en désaccord avec nos observations. Toutefois, Magalhães *et al.*, (2011) ont montré que l'abondance des communautés de procaryotes dans les sédiments avait été stimulée par des contaminations en Cu fortes (< 60 $\mu gCu.g^{-1}$ de

sédiment) puis qu'elle diminuait lorsque les concentrations devenaient trop élevées. Dans le même sens, Corcoll *et al.*, (2019) ont observé une diminution significative de la concentration totale en pigments et de la photosynthèse (pour les communautés eucaryotes) et de la diversité des procaryotes et des eucaryotes dans les biofilms marins à partir de 60 nM de Cu. Enfin, deux études ont montré que l'ajout de plus de 80 nM de Cd n'avait pas eu d'effet sur la diversité des communautés de bactérioplancton (Wang *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017). Ces différents éléments suggèrent une variabilité des réponses microbiennes selon le compartiment et le stress métallique subit.

Des tests de toxicité réalisés au laboratoire durant un stage DUT que j'ai co-encadré ont montré que l'EC_{50} pour des procaryotes issus de la zone la moins contaminée de la rade de Toulon était d'environ 10 µM de Cu (Communication personnelle) (Figure VII-3). De telles concentrations n'ont jamais été observées dans l'eau de la rade de Toulon durant cette thèse et par ailleurs (Rossi and Jamet, 2008; Jean *et al.*, 2012). La première hypothèse qui peut alors être formulée est que les concentrations en ETMs dans les sédiments ou la colonne d'eau de la rade de Toulon ne sont pas assez élevées ou biodisponibles pour induire des effets négatifs sur l'abondance et la richesse de la communauté de procaryotes. Cette hypothèse va dans le sens des observations faites lors des expérimentations en mésocosmes, où l'ajout de Cu et/ou de Pb aux concentrations maximales observées dans l'eau de la rade a stimulé la croissance du bactérioplancton.

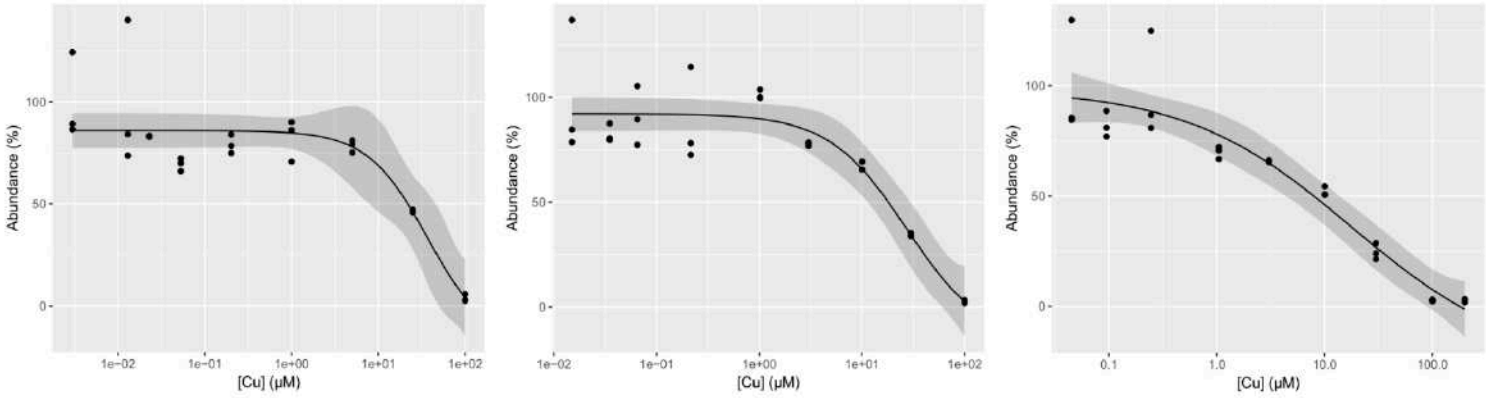


Figure VII-3 Courbes Dose-réponse montrant la tolérance au Cu du groupe des procaryotes de 3 sites le long du gradient multiple de contamination en ETMs dans la rade de Toulon. De gauche à droite : 41p correspond au site très peu contaminé, LAZ au site intermédiaire et 6ext au site très contaminé.

Le concept de PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) se base sur la capacité d'adaptation des organismes et considère que des communautés biologiques, déjà exposées à un contaminant, acquièrent une tolérance par rapport aux communautés peu ou pas exposées à une contamination (Blanck, 2002). C'est la deuxième hypothèse qui peut être proposée au vu des résultats de cette thèse : les communautés planctoniques, de biofilms ou benthiques dans la rade de Toulon peuvent être exposées à des concentrations en ETMs non toxiques de façon persistante et ainsi développer et entretenir une tolérance limitant l'effet d'une nouvelle contamination.

Les expérimentations en mésocosmes réalisées durant cette thèse ont montré que la structure taxonomique du bactérioplancton dans les zones très contaminées de la rade de Toulon avait été moins sensible à l'ajout de Cu que celle du bactérioplancton issu des zones moyennement et faiblement contaminées. Ceci va dans le sens d'une augmentation de la tolérance/résistance d'une communauté pré-exposée aux ETMs. Dans le même sens, Corcoll *et al.*, (2019) ont montré que plus les concentrations en Cu étaient fortes durant la période de pré-exposition (18 jours) des communautés de biofilms, plus l'EC_{50} des communautés était élevée. Ainsi, la pré-exposition au Cu a conduit à l'augmentation de la tolérance de la communauté microbienne en quelques jours. Dans la rade de Toulon, le temps de résidence est de 4,5 jours en moyenne et peut être plus long dans les zones enclavées de la PR. Ce temps de résidence a été suffisant pour induire une tolérance d'une partie des communautés microbiennes de la colonne d'eau.

Dans les sédiments, l'absence de tendance nette d'abondance des communautés microbiennes liée à la contamination métallique (Misson *et al. In prep*) et la plus forte diversité dans les zones contaminées (Misson *et al.*, 2016) pourrait aussi être due à l'augmentation de la tolérance des communautés vis-à-vis des ETMs. La tolérance des communautés benthiques pourrait être d'autant plus forte que la contamination des sédiments dans la rade de Toulon est ancienne et stable dans le temps (Tessier *et al.*, 2011; Daniel Cossa *et al.*, 2014; Dang, Lenoble, *et al.*, 2015; Dang, Schäfer, *et al.*, 2015; Misson *et al.*, 2016). L'apparente stabilité du compartiment sédimentaire en comparaison à la colonne d'eau (hydrodynamisme) a pu favoriser la sélection d'une communauté résistante aux contaminations en permettant une exposition chronique aux ETMs (Misson *et al.*, 2016). Dans le même sens, Pringault *et al.*, (2012) ont démontré que les communautés de sédiments contaminés en Zn avaient développé une tolérance aux ETMs. Enfin, la remise en suspension de microorganismes

benthiques résistants aux ETMs dans la colonne d'eau a aussi pu participer à l'acquisition d'une certaine tolérance/résistance de la communauté de bactérioplancton vis-à-vis de la contamination métallique.

VII.3.2.Composition des communautés microbiennes en lien avec la contamination en ETMs

VII.3.2.1. Les communautés ultraplanctoniques

Le concept du PICT est basé sur le fait qu'une exposition d'une communauté à un contaminant peut induire une sélection des organismes les plus tolérants ou l'établissement de mécanismes de détoxification dans la communauté. L'abondance et/ou la diversité de la communauté n'est alors pas modifiée ou est revenue à son état initial, mais la composition de la communauté peut être totalement modifiée. Ainsi, il est nécessaire d'étudier la composition des communautés microbiennes afin de pouvoir interpréter d'une manière plus complète l'effet d'une contamination métallique.

Les campagnes de terrain ont mis en évidence un changement de composition au sein des communautés ultraphytoplanctoniques déterminées par la cytométrie en flux (Figure VII-4). Les zones les plus contaminées de la rade de Toulon étaient presque exclusivement dominées par le groupe des picoeucaryotes-like et dans une moindre mesure par les nanoeucaryotes-like. Les abondances des *Prochlorococcus*-like et les *Synechococcus*-like étaient très faibles dans ces zones. Inversement, dans les zones très peu contaminées ouvertes sur la Méditerranée, une dominance de *Synechococcus*-like a été observée. Ce changement de structure le long du gradient multiple de contamination en ETMs a été en partie expliqué par la contamination métallique, *i.e.* environ 60% de la variabilité des communautés ultraphytoplanctoniques dans la rade de Toulon est expliquée statistiquement par la contamination en Cd, Cu, Pb et Zn dissous de l'eau. Un changement similaire de composition des communautés ultraphytoplanctoniques dans une zone côtière soumise à de fortes perturbations métalliques a déjà été démontré par ailleurs (Lafabrie *et al.*, 2013; Ben Othman *et al.*, 2017; Goni-Urriza *et al.*, 2018).

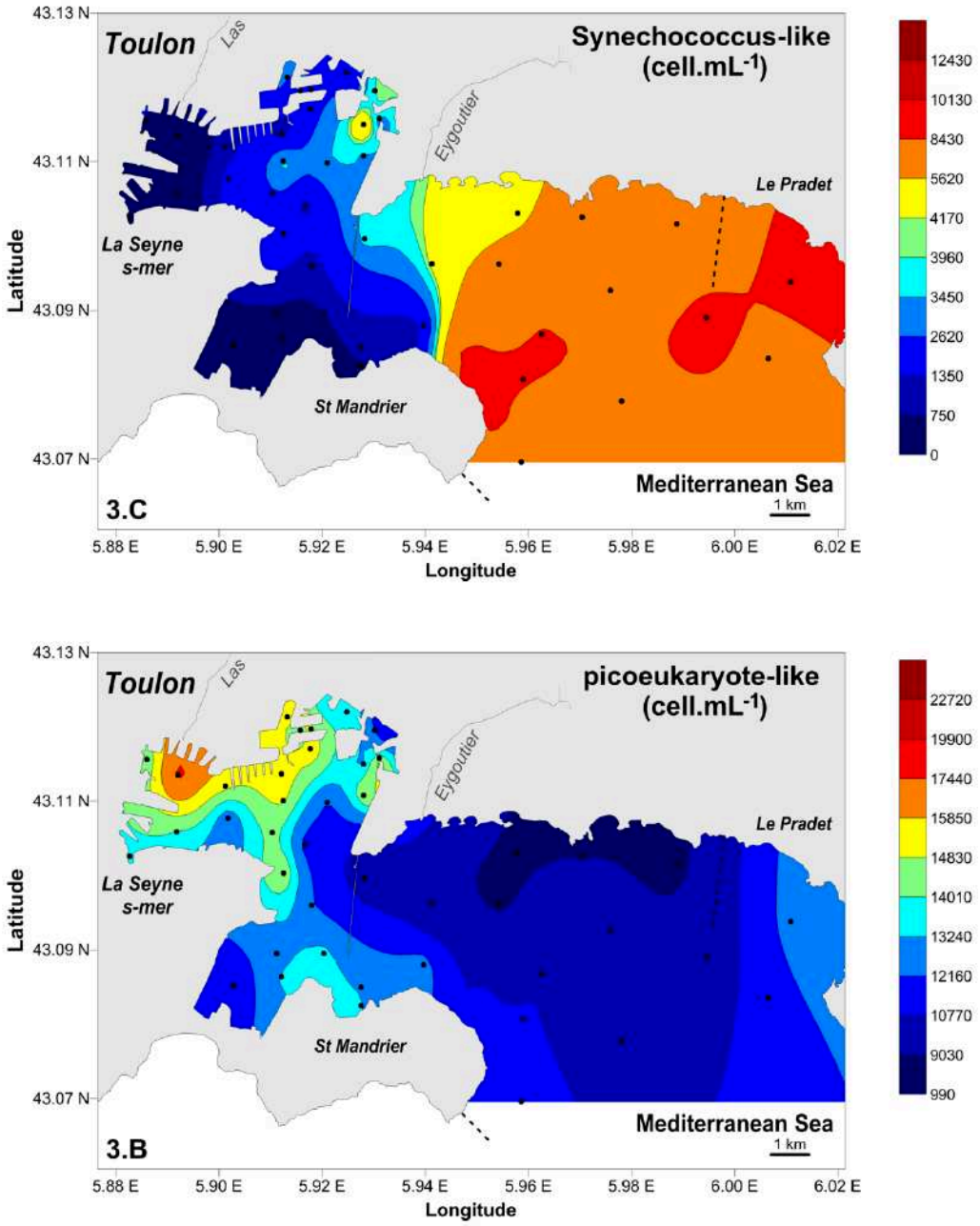


Figure VII-4 Abondance des groupes Synechococcus-like et picoeucaryotes photosynthétiques en surface de la colonne d'eau de rade de Toulon, déterminée par cytométrie en flux (Chapitre III, article 1).

Un changement de composition de la communauté de bactérioplancton a aussi été observé le long du gradient multiple de contamination en ETMs dans la rade de Toulon. La communauté de bactérioplancton dans les sites peu contaminés étaient principalement composées de groupes caractéristiques des zones peu anthropisées (Fuhrman and Steele, 2008; Gilbert *et al.*, 2009, 2012; Sunagawa *et al.*, 2015). Ainsi les familles associées aux classes

Alphaproteobacteria (SAR11, Rickettsiales, Rhizobiales, and Rhodobacteraceae) et Cyanobacteria (*Synechococcus*) étaient dominantes en zone peu contaminée. La composition de la communauté de bactérioplancton des sites les plus contaminés était, elle, dominée par des taxa associés aux classes d'Actinobacteria (*Candidatus Aquiluna*), de Flavobacteria (*Formosa* et *Tenacibaculum*), de Bacteroidetes (NS11-12 marine group), de Betaproteobacteria (*Hydrogenophilaceae*) et de Gammaproteobacteria (Halieaceae). Ces groupes sont généralement retrouvés dans des environnements perturbés, dans des sédiments contaminés en Cu (Albarracín *et al.*, 2010; Païssé *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Besaury *et al.*, 2014) ou dans des rivières contaminées en Zn (Ni *et al.*, 2016). Ils sont aussi connus pour participer à la dégradation des hydrocarbures ou pour utiliser certains ETMs comme source de nutriments (Acosta-González *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2017; Garris *et al.*, 2018). En comparaison de l'influence de la contamination métallique sur les communautés ultraphytoplanctoniques, les ETMs sont apparus moins structurants pour les communautés de bactérioplancton dans la rade de Toulon mais ils expliquaient tout de même statistiquement près de 30% de la variabilité biologique.

L'ajout artificiel d'ETMs dans des concentrations proches de celle retrouvées dans la rade de Toulon a permis de reproduire expérimentalement certains des changements de composition observés le long des gradients métalliques de la rade de Toulon. Toutefois, l'ajout d'ETMs a eu peu d'effet sur la composition de la communauté de bactérioplancton déjà soumis à un stress métallique, allant dans le sens d'une augmentation de la tolérance face aux ETMs des communautés microbiennes pré-exposées.

En conclusion, malgré une absence de gradient de l'abondance totale de la communauté ultraplanctonique le long du gradient multiple de contamination en ETMs, un changement de composition au sein des communautés ultraphytoplanctoniques et bactérioplanctoniques a été observé. Ce changement de composition peut être expliqué par le gradient métallique dans la rade de Toulon. Enfin, la tolérance de la communauté de bactérioplancton à une contamination en ETMs a été supérieure dans les zones contaminées par rapport aux zones très peu contaminées. Des mécanismes de sélection ont pu être acquis en quelques jours par la communauté grâce à une exposition aux ETMs longue et stable dans le temps, et cela même dans un système dynamique, lié aux conditions hydrodynamiques de la masse d'eau.

VII.3.2.2. Les communautés microbiennes dans les biofilms

Contrairement aux observations faites pour les communautés ultraplanctoniques de la rade de Toulon, les liens statistiques entre la contamination multiple en ETMs et la composition des communautés de procaryotes des biofilms dans la rade de Toulon ne sont pas apparus évidents. En effet, le premier facteur de différenciation des communautés de procaryotes de biofilm était la profondeur. Les différences de composition des biofilms intersites étaient plus faibles qu'entre les biofilms de surface et de fond à un même site. Dans ce sens, la répartition spatiale des communautés de biofilm diffère fortement de la répartition spatiale des communautés planctoniques étudiées jusque-là durant cette thèse. Le fait de ne pas observer les mêmes modèles de répartition spatiale et les mêmes liens statistiques forts pour les communautés de biofilm peut être lié à leurs capacités de résistance aux ETMs différentes et plus complètes que les cellules planctoniques dans la colonne d'eau (Harrison *et al.*, 2007). Flemming *et al.*, (2016) considèrent les biofilms comme une forteresse, où les cellules sont protégées de l'effet toxique des ETMs par une matrice extracellulaire. Cependant, certains groupes taxonomiques ont pu être identifiés comme caractéristiques de biofilms des zones contaminées en ETMs. Les taxa OM190, BD1-7 clade, *Tenacibaculum Flavobacteriaceae*, JTB255 MBG, *Flammeovirgaceae* et *Aquibacter*, notamment ont été retrouvés abondants dans les biofilms du fond des sites les plus contaminés de la rade de Toulon. Certains de ces groupes sont connus pour être présents dans des sédiments contaminés en ETMs ou en hydrocarbures (Webster and Negri, 2006; Wang *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2018; Godoy-Lozano *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2019). Ceci laisse à penser que des interactions dont la nature reste à définir entre les communautés benthiques et de biofilms sont effectives dans la rade de Toulon. Ces relations peuvent être le résultat de remise en suspension des microorganismes benthiques présents dans les couches supérieures des sédiments. Enfin, dans les biofilms des zones contaminées de la rade de Toulon, la présence de certains groupes comme les JTB 255 MBG, décrits dans la littérature comme peuplant des sédiments contaminés (Webster and Negri, 2006; Wang *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2018; Godoy-Lozano *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2019), laisse à penser que la contamination des sédiments en ETMs a une influence sur la composition des communautés de biofilms et benthiques de la rade de Toulon.

VII.3.2.3. Mise en relation des 3 compartiments

Dans les sédiments comme dans la colonne d'eau, les ETMs sont aussi apparus comme un facteur de structuration fort pour les communautés de procaryotes (Misson *et al.*, 2016). Dans cette étude, les auteurs ont alors pu mettre en évidence des liens statistiques forts entre le gradient multiple de contamination en ETMs des sédiments et la structure des communautés microbiennes benthiques. Cependant, des analyses de la composition des communautés microbiennes par séquençage du gène de l'ARNr 16S apparaissent nécessaires pour mettre en évidence les relations entre les communautés des différents compartiments. L'étude de la composition du bactérioplancton, des biofilms et des sédiments lors de phénomènes de remise en suspension semble aussi très intéressante afin de comprendre l'influence de chaque compartiment sur la dynamique des autres lorsqu'ils peuvent être en contact. Ainsi, cette thèse a permis de mettre en évidence des réponses différentes en termes de diversité et de composition des communautés selon le compartiment étudié face à une contamination métallique.

Pris tous ensemble, ces résultats vont dans le sens d'une sélection par les ETMs due à des mécanismes de sensibilité et de tolérance, sélection limitée par la résistance à la contamination selon le compartiment, conduisant à une stabilité des communautés plus ou moins forte selon le mode de vie des microorganismes. Cette variabilité peut être due aux caractéristiques intrinsèques des compartiments étudiés. En effet, les sédiments proposent un environnement stable avec relativement peu de variations temporelles des conditions environnementales. Les concentrations en ETMs élevées et constantes dans les sédiments de la rade de Toulon ont pu exercer une pression de sélection continue sur les communautés benthiques conduisant à la sélection de microorganismes résistants et donc à la stabilité de la communauté (Allison and Martiny, 2008; Shade *et al.*, 2012). Cette sélection d'individus résistants aux ETMs a pu se faire grâce à des mécanismes de transferts horizontaux de gènes entre microorganismes. Ce mécanisme a déjà été décrit dans des sédiments contaminés en ETMs (Gillan *et al.*, 2015).

Dans l'eau, les conditions environnementales sont beaucoup plus variables que dans les sédiments notamment par le fait des conditions hydrodynamiques. Le renouvellement complet d'une masse d'eau contaminée par une masse d'eau très peu contaminée dans la rade de Toulon est en moyenne de 3.4 jours (Dufresne *et al.*, 2014). Pourtant en quelques

jours, la diversité et la composition de la communauté ultraplanctonique dans les zones contaminées évoluent et se différencient de la composition des zones très peu contaminées. Cela laisse penser que la contamination en ETMs dans la rade à un effet rapide sur la composition de la communauté ultraplanctonique mais que le temps de résidence de la communauté au contact de la contamination est trop faible pour permettre une résistance forte et une stabilité de la communauté.

En comparaison de la communauté ultraplanctonique, les communautés de biofilm et benthiques étaient géographiquement immobiles mais tout de même soumis aux variations physiques, chimiques et biologiques de la colonne d'eau. Dans ce sens, ces deux communautés subissent des variations environnementales du milieu potentiellement plus brutales que la communauté ultraplanctonique, qui se déplace avec les masses d'eau. Les biofilms peuvent alors subir pleinement le renouvellement de masse d'eau, parfois très rapide, quand la communauté ultraplanctonique n'est exposée qu'à des mélanges de masses d'eau plus ou moins progressifs. Le mode de vie en biofilm semble très adapté aux changements rapides des conditions environnementales, notamment par la présence d'une matrice extracellulaire qui protège les cellules et joue un rôle de tampon face aux variations des conditions environnementales (Flemming and Wingender, 2010). Les biofilms semblent tout de même sensibles aux variations biotiques dans la colonne d'eau. Ainsi, la composition de la communauté des biofilms semble dépendante de la présence de potentiels colonisateurs dans l'environnement proche du biofilm. Toutefois, il semble y avoir ensuite une sélection forte et rapide des taxa qui compose les biofilms par rapport à la communauté ultraplanctonique, qui se matérialise par la nette différence de composition de ces deux communautés.

Ces différences de réponses entre les communautés planctoniques, de biofilms ou benthiques montrent que des facteurs de structuration des communautés microbiennes autres que les ETMs sont présents dans la rade de Toulon et qu'ils n'ont pas la même influence selon le compartiment étudié.

VII.4. Importance d'autres facteurs biotiques et abiotiques sur la dynamique des communautés microbiennes

VII.4.1.Importance du couplage bactérioplancton-ultraphytoplancton et des relations biotiques en général

La contamination en ETMs peut induire une modification de la composition des communautés microbiennes, induite par des variations de sensibilité, de résistance et de résilience aux ETMs entre les groupes taxonomiques. Le changement de composition au sein de la communauté de bactérioplancton observé expérimentalement après l'ajout de Cu peut aussi être expliqué par le couplage bactérioplancton-ultraphytoplancton (Needham and Fuhrman, 2016; Needham *et al.*, 2017). L'analyse des réseaux de co-occurrence sur les données de terrain a permis de mettre en évidence des liens statistiques forts entre certains taxa bactériens et les groupes ultraphytoplanctoniques et notamment les picoeucaryotes (Figure VII-5). Certains groupes de bactérioplancton présents dans les zones les plus contaminées de la rade de Toulon étaient statistiquement corrélés avec l'abondance des groupes pico- et nanophytoplanctoniques (losanges gris dans la Figure VII-5). L'influence forte des gradients multiples en ETMs sur l'abondance et la composition des communautés ultraphytoplanctoniques dans la rade de Toulon a pu indirectement influencer l'abondance et la composition des communautés de bactérioplancton. En effet, des variations d'abondance et de composition de la communauté ultraphytoplanctonique ont pu conduire à des quantités et qualités de matière organique exsudée différentes (Pinhassi *et al.*, 2004; Teeling *et al.*, 2012; Baltar *et al.*, 2015; Goni-Urriza *et al.*, 2018). Ainsi, le couplage étroit bactérioplancton-ultraphytoplancton a pu avoir une incidence forte, notamment dans les zones contaminées de la rade de Toulon. L'observation de groupes identifiés comme copiotrophes (*i.e.* Haliaceae, Microbacteriaceae, Rhodobacterales) au sein de communautés de bactérioplancton soumises à un stress cuprique semble aller dans le sens de l'importance du couplage bactérioplancton-ultraphytoplancton pour expliquer les variations de composition des communautés microbiennes le long des gradients métalliques de la rade de Toulon. Ces observations ne permettent cependant pas de conclure sur la part de l'influence directe (toxicité) ou indirecte (mortalité du phytoplancton) des ETMs pour expliquer ces changements de composition. Pour cela, il serait nécessaire de dissocier les communautés de bactérioplancton et

d'ultraphytoplancton afin d'étudier l'effet spécifique des ETMs sur chaque groupe. Pour l'heure, il apparait très difficile de dépasser ce verrou expérimental car les deux communautés sont étroitement liées. Toutefois, quel que soit le type d'influence, les ETMs ont un effet et induisent des réponses des communautés microbiennes.

L'analyse des réseaux de co-occurrence a aussi permis de mettre en évidence l'importance des interdépendances entre taxa bactériens, bien plus nombreuses que celles entre ces taxa et les variables environnementales, ETMs compris. Il a déjà été montré que la structure des communautés microbiennes pouvait aussi être influencée par les interactions entre espèces (Lima-mendez *et al.*, 2015). Ces interactions peuvent être de différentes natures : coopération (Eiler *et al.*, 2011; Chow *et al.*, 2013) ou compétition (Fuhrman and Steele, 2008; Berdjeb *et al.*, 2018). Cela suggère que la contamination en ETMs dans la rade de Toulon a eu une influence directe limitée à seulement quelques taxa de la communauté mais des conséquences potentielles nombreuses par la voie des interactions biotiques entre le bactérioplancton et l'ultraphytoplancton.

Enfin, d'autres interactions biotiques, qui n'ont pas été prises en compte durant cette thèse peuvent aussi en partie expliquer la structuration des communautés microbiennes dans la rade de Toulon. Ainsi, les infections virales (Riemann and Middelboe, 2002; Middelboe and Jörgensen, 2006) et la prédation par des organismes hétérotrophes (*e.g.* nanoflagellés) (Hahn and Ho, 2001; Steele *et al.*, 2011; Baltar *et al.*, 2015) pourraient être des éléments contribuant à la variabilité biologique mesurée.

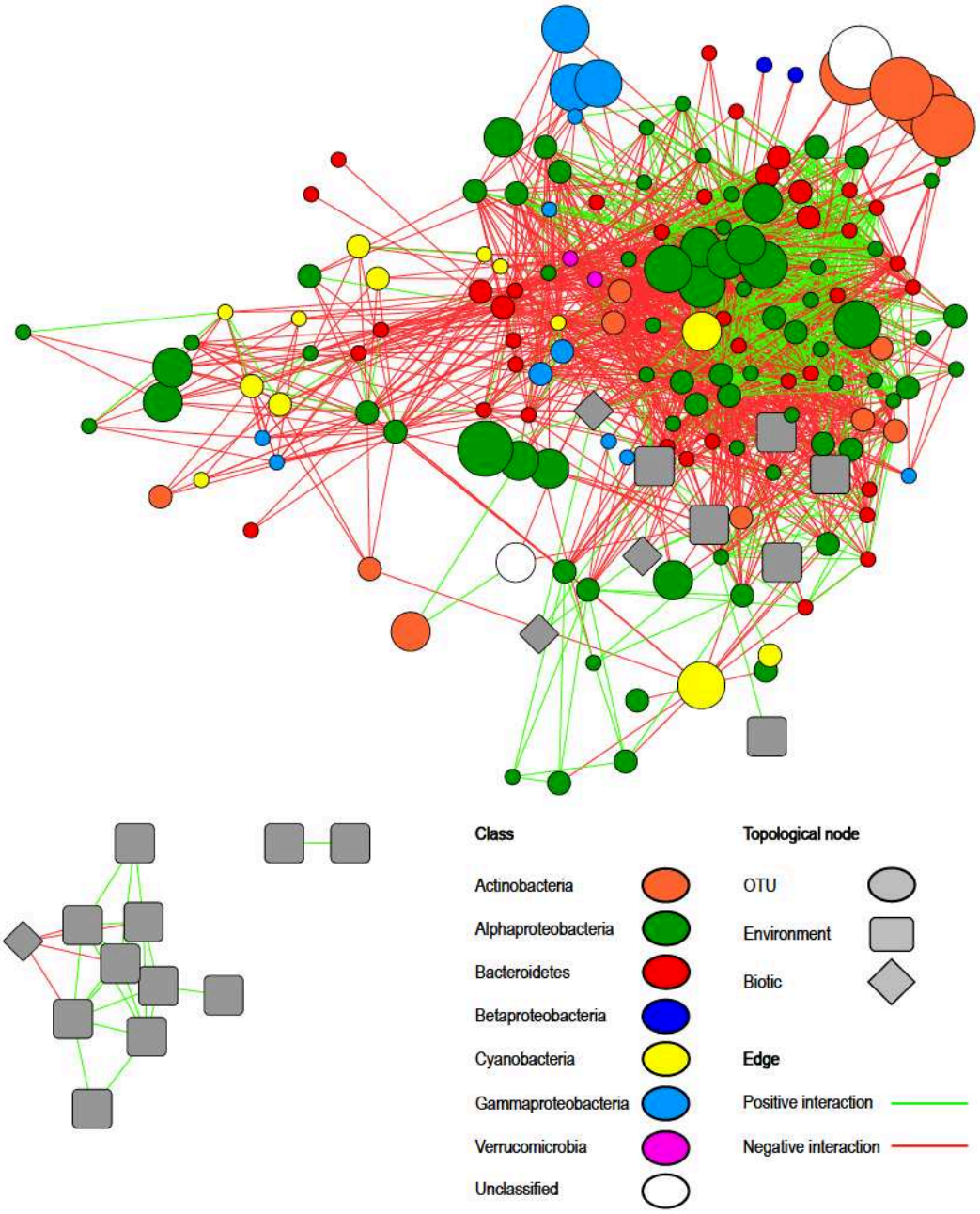


Figure VII-5 Réseau de co-occurrence basé sur la communauté de bactérioplancton, la communauté ultraphytoplanctonique et les variables environnementales dans la rade de Toulon. Les ronds représentent les taxa bactériens, les carrés gris représentent les variables environnementales et les losanges gris représentent l'abondance des 4 groupes ultraplanctoniques (3 groupes ultraphytoplanctoniques : SYN, pico- et nanoeucaryotes et un groupe procaryotes hétérotrophes) déterminée par cytométrie en flux (Chapitre IV, article 3).

VII.4.2.Influence des conditions hydrodynamiques

Les différences de réponses des communautés selon le compartiment, discutées précédemment peuvent être étroitement liées aux conditions hydrodynamiques dans la rade de Toulon. En effet, le temps de résidence estimé de l'eau dans la petite rade de Toulon est en moyenne de 3.4 jours (Dufresne *et al.*, 2014). Par temps calme, le temps de résidence peut être de 7 jours et bien plus dans les zones enclavées de la PR, très contaminées. Au contraire par temps de forts vents, le remplacement complet d'une masse d'eau en un site donnée de la petite rade peut être très rapide de l'ordre de quelques heures à 1 jour. Le renouvellement plus ou moins rapide des masses d'eau amène par conséquent une nouvelle communauté dans une eau qui sera contaminée progressivement par mélange avec une masse d'eau contaminée ou par contact avec une source d'ETMs. La colonne d'eau de la rade de Toulon est donc un système dynamique dans lequel les communautés microbiennes sont rarement soumises à une exposition brutale ou de longue durée aux ETMs. Ces conditions hydrodynamiques empêchent probablement une mortalité élevée de la communauté microbienne, expliquant le contraste entre l'absence de modification d'abondance de l'ultraphytoplancton dans les sites les plus contaminés de la rade et les expérimentations en laboratoire où l'ajout d'ETMs aux mêmes concentrations avait tué près de 99% des cellules ultraphytoplanctoniques en 4 jours. Pris ensemble, ces résultats laissent penser que le mouvement des masses d'eau dans la rade de Toulon a une influence importante sur la réponse de la communauté ultraplanctonique.

VII.4.3. Effets d'une remise en suspension de sédiments

Lors d'épisodes climatiques exceptionnels, notamment par forts vents, les conditions hydrodynamiques peuvent entrainer une remise en suspension de sédiments. Les activités anthropiques comme le transport maritime ou des opérations de dragage peuvent aussi conduire à une remise en suspension de sédiments. La faible profondeur de la colonne d'eau dans la PR favorise les processus de remise en suspension. Le stock d'ETMs dans les sédiments des zones très contaminées de la rade de Toulon peut ainsi être remis en suspension dans la colonne d'eau (Tessier *et al.*, 2011; Dang, Lenoble, *et al.*, 2015) et contribuer à l'établissement des gradients biologiques dans la colonne d'eau. La campagne de terrain menée lors d'une période de dragage dans la rade de Toulon a montré que la structuration spatiale des groupes

ultraphytoplanctoniques a été accentuée avec la prise en compte de la zone où les sédiments étaient déposés. Le groupe des picoeucaryotes-like était encore plus dominant dans cette zone alors que les *Synechoccocus*-like étaient encore moins représentés qu'ailleurs. L'augmentation des concentrations de Pb et de Cu dissous et totaux due au stockage et à la remise en suspension de sédiments contaminés a ainsi pu renforcer la structuration des communautés ultraphytoplanctoniques dans la rade de Toulon durant cette période. Plusieurs études ont montré un changement de structure des communautés ultraphytoplanctoniques après une remise en suspension de sédiments contaminés (Lafabrie *et al.*, 2013; Ben Othman *et al.*, 2017; Goni-Urriza *et al.*, 2018). Dans ces études, l'augmentation des concentrations des contaminants organiques et inorganiques dans la colonne d'eau a stimulé la croissance des groupes de pico- et nanoeucaryotes planctoniques. Une expérience de remise en suspension de sédiments contaminés a été réalisée au cours de cette thèse afin de mieux comprendre les processus qui régissent les variations de structure des communautés ultraphytoplanctoniques observées lors d'une opération de dragage. Pour cette expérience, afin de limiter l'influence de l'augmentation de turbidité sur la photosynthèse et sur la détection des cellules par cytométrie en flux, le mélange eau-sédiments a été filtré et c'est l'élutriat ainsi obtenu qui a été mis en contact avec la communauté planctonique. Cette expérience a mis en évidence la stimulation de la communauté phytoplanctonique après une contamination de l'eau lors d'une remise en suspension de sédiments, mais aussi un changement de structure de la communauté. Bien que cette expérience ait été initiée avec une communauté issue d'une zone très peu contaminée, à la fin de l'expérimentation, la structure de la communauté était similaire à celle retrouvée dans les zones les plus contaminées de la rade de Toulon, confirmant le rôle important d'une remise en suspension de sédiments.

Enfin, la remise en suspension de sédiments et de microorganismes libres ou attachés aux particules (biofilm benthique) a pu influencer le processus de colonisation des surfaces artificielles et de formation des biofilms. Ainsi, durant les campagnes de terrain, les biofilms du fond de la colonne d'eau étaient dominés par des Gammaproteobacteria (*Arenicella, Haliaceae,* BD1-7 clade, et JTB255 MBG), des Bacteroidetes (Draconibacteriaceae, Cryomorphaceae, Flavobacteriaceae, et NS11-12 MG) et des Planctomycetes OM190. Plusieurs études ont aussi montré la présence de ces groupes dans des communautés microbiennes de sédiments contaminées (Webster and Negri, 2006; Wang *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2018; Godoy-Lozano *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2019). Enfin, une étude récente a montré

une présence importante de Bacteroidetes et de JTB255 MBG dans la partie superficielle des sédiments contaminés de la rade de Toulon (Misson *et al. In prep*). La partie superficielle des sédiments remise en suspension a ainsi pu influencer la structure des communautés de biofilm au fond de la colonne d'eau, proche des sédiments, en fournissant un pool d'organismes potentiellement capables de coloniser des surfaces immergées au fond de la colonne d'eau. Certains microorganismes présents dans les sédiments ont déjà été identifiés comme des colonisateurs de surface et ensuite retrouvés abondant dans les communautés de biofilm (Battin *et al.*, 2001; Webster and Negri, 2006). Cela va dans le sens d'observations faites à l'interface eau/sédiment, où des microorganismes sont capables de former des biofilms dits benthiques sur des particules sédimentaires (McDougald *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2017).

En conclusion, la remise en suspension de sédiments peut avoir de nombreuses influences sur les communautés microbiennes se développant dans la colonne d'eau, par la remise en suspension de microorganismes benthiques et d'ETMs dans la colonne d'eau et par la remise en suspension de contaminants organiques.

VII.4.3.Potentiels effets d'une contamination organique

Plusieurs études ont mis en évidence la contamination en contaminants organiques des sédiments de la rade de Toulon (Misson *et al.*, 2016; Wafo *et al.*, 2016; Guigue *et al.*, 2017). Même s'il n'existe à l'heure actuelle aucune étude faisant état de la contamination en HAPs de la colonne, Guigue *et al.* (2017) ont montré qu'une remise en suspension de sédiments contaminés en HAPs, prélevés dans la rade de Toulon avait conduit à une augmentation de 10 fois les concentrations en HAPs dans l'eau environnante (Figure VII-6). Le rapport final du réseau de surveillance « Réseau Intégrateur Biologiques (RINBIO) » des eaux littorales de la rade de Toulon a reporté 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), 2 polychlorobiphényles (PCB) et 9 contaminants organiques dont du méthylmercure et du tributylétain (TBT). Ce rapport montre que les moules élevées dans la PR présentent un niveau de contamination en HAP et PCB plus important que les moules élevées dans la GR. Ceci confirme la présence d'une contamination en contaminants organiques dans la colonne d'eau de la rade de Toulon dont une partie pourrait provenir de la remise en suspension sédiments historiquement contaminés. Misson *et al.*, (2016) ont montré que la contamination en composés organométalliques (MMHg et TBT) dans les sédiments était fortement liée aux

variations spatiales de diversité et de composition des communautés de procaryotes. La contamination en composés organométalliques a déjà été montrée comme structurante pour les communautés microbiennes benthiques (Quero *et al.*, 2015; Jeanbille *et al.*, 2016; Kaci *et al.*, 2016). Ben Othman *et al.* (2017) ont montré que la réponse structurale (abondance et taxonomie) et fonctionnelle (production et respiration) d'une communauté phytoplanctonique avait été modifié en présence de contaminants organiques (HAPs et PCBs) issus d'une remise en suspension de sédiments. Cette étude a montré qu'une exposition aux contaminants avait stimulé la communauté ultraphytoplanctonique. Rodríguez *et al.* (2018) ont montré que l'ajout de contaminants organiques avait conduit à une réduction de la diversité et de l'activité bactérienne dans la colonne d'eau. Les contaminants organiques ont aussi été montrés comme toxiques pour la communauté phytoplanctonique de l'océan Atlantique du large, même à des concentrations traces (maximum 2 $pg.L^{-1}$ et 1200 $pg.L^{-1}$ pour les PCBs et les HAPs, respectivement) (Echeveste *et al.*, 2010). Il apparait clair que les contaminants organiques jouent un rôle important sur l'abondance, la diversité et la composition des communautés microbiennes. Il convient alors d'identifier leur impact sur les communautés dans la rade de Toulon, et les possibles interactions avec la contamination en ETMs.

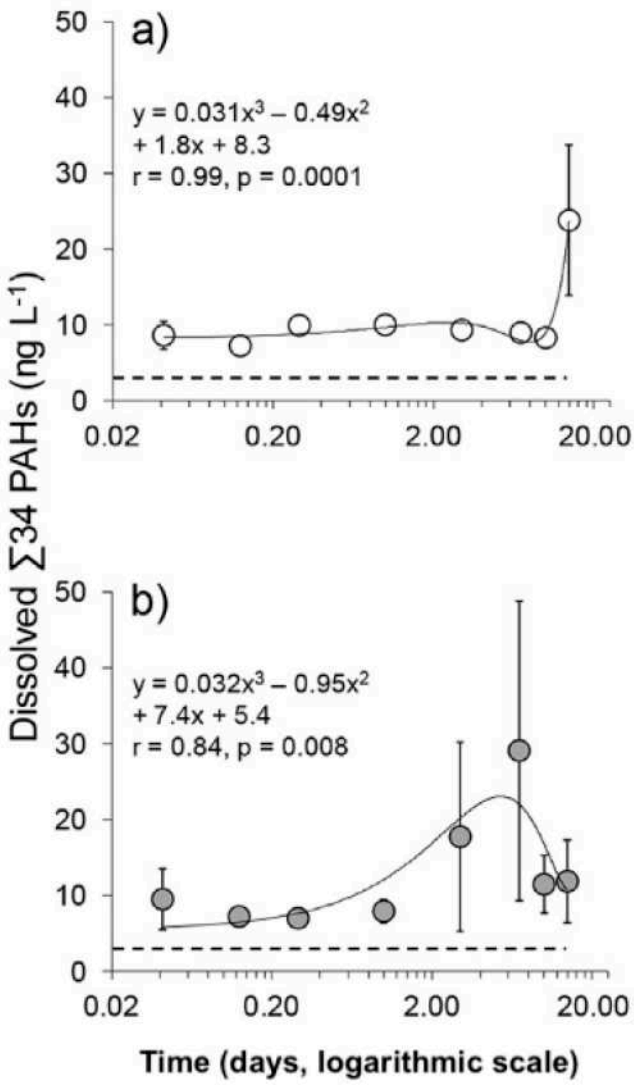


Figure VII-6 Concentrations de la somme des 34 HAPs mesurés (ng.L-1) dans l'eau durant une expérience de remise en suspension de sédiments de surface (0 – 2 cm) (a) et de sédiments plus profonds (30 – 32 cm) (b). La ligne en pointillés représente la concentration dans l'eau de mer avant mise en contact avec les sédiments (Guigue et al., 2017).

VII.5. *Synechococcus* : un groupe taxonomique représentatif des variations de contamination dans la rade de Toulon

VII.5.1.Répartition spatiale de *Synechococcus* dans la rade de Toulon

Le genre *Synechococcus* a montré un gradient d'abondance marqué généralement inverse à celui du gradient multiple de contamination en ETMs de la rade de Toulon. Les zones très peu contaminées et ouvertes sur le large étaient dominées par le groupe *Synechococcus* alors qu'il

était très peu présent dans les zones très contaminées (Figure VII-4). Par exemple, en Février 2014, l'ultraphytoplancton des zones très peu contaminées était composé d'environ 90% de *Synechococcus* alors qu'en Février 2015, il était composé à 60% de *Synechococcus* et 40% de picoeucaryotes. Dans les zones moyennement contaminées, le suivi à long terme a montré que l'abondance de *Synechococcus* était importante et qu'il représentait en moyenne 75% de l'abondance ultraphytoplanctonique totale. Malgré certaines variations temporelles de l'amplitude du gradient d'abondance de *Synechococcus*, les observations faites lors des campagnes de terrain ont toujours montré que le gradient d'abondance de *Synechococcus* était présent dans la colonne d'eau de la rade de Toulon. Ces observations sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que l'abondance de *Synechococcus* décroit généralement avec l'augmentation des concentrations en ETMs. Moffett *et al.*, (1997) ont montré que *Synechococcus* était dominant dans les eaux côtières du Massachusetts mais que l'abondance diminuait drastiquement le long d'un gradient de Cu (entre 5 et 80 nM de Cu dissous). D'une manière générale, *Synechococcus* est abondant dans des zones côtières peu ou pas soumises à de fortes influences anthropiques (Grégori *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2002; Mella-Flores *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2015).

VII.5.2.Influences des ETMs sur le gradient d'abondance de *Synechococcus*

La répartition de *Synechococcus* le long du gradient multiple en ETMs dans la rade de Toulon a pu s'expliquer par la forte sensibilité de ce groupe vis-à-vis des ETMs. Une expérience en microcosmes conduite durant cette thèse a montré que l'abondance de *Synechococcus* diminuait de façon drastique après un ajout d'un cocktail d'ETMs. L'abondance des autres groupes ultraphytoplanctoniques (*i.e.* picoeucaryotes et nanoeucaryotes) a aussi diminué mais la résilience quantitative de *Synechococcus* est apparue plus faible comparée à celle des autres groupes. D'une manière générale, la sensibilité des organismes autotrophes au Cu est bien connue (Jordi *et al.*, 2012; Rouco *et al.*, 2014; Goni-Urriza *et al.*, 2018). Le ratio surface sur volume plus important pour les cellules de *Synechococcus* que pour les cellules des pico- et nanoeucaryotes peut être une explication à la plus forte sensibilité de *Synechococcus* par rapport aux autres groupes autotrophes. Plus la cellule est petite, plus le rapport surface sur volume est important, et plus la surface d'échange avec le milieu environnant rapportée au volume cellulaire et donc l'exposition de la cellule aux ETMs augmentent. En effet, les

microorganismes de petite taille présentent une plus forte capacité d'absorption des contaminants à l'intérieur des cellules et donc une sensibilité aux ETMs plus forte (Miao *et al.*, 2005; Echeveste *et al.*, 2012, 2014).

Si le rapport surface sur volume important de *Synechococcus* peut induire une capacité d'absorption importante des ETMs, il a aussi pu favoriser l'absorption et l'utilisation des nutriments présents dans le milieu. Dans ce sens, l'ajout artificiel de nitrate dans les conditions expérimentales a favorisé la croissance de *Synechococcus* qui est devenu majoritaire dans la communauté ultraphytoplanctonique. L'ajout de nitrate a pu déséquilibrer le ration N :P, conduisant à une limitation des phosphates dans le milieu et favorisant les cellules avec un ration surface sur volume plus important. Toutefois, l'ajout de nitrate en présence d'ETMs n'a pas permis d'éviter ni même de limiter la mortalité de *Synechococcus* dans l'expérience en microcosmes réalisée pendant cette thèse. De plus, lors du suivi de terrain pluriannuel, le gradient de *Synechococcus* dans la rade de Toulon a encore été plus marqué en période de dragage, et son abondance était particulièrement faible dans la zone de dépôt des sédiments. Dans le même sens, l'ajout d'un élutriat de sédiments a eu un impact négatif sur l'abondance de *Synechococcus*. Bien que l'élutriat ait été enrichi en nutriments, cela n'a pas empêché la chute d'abondance de *Synechococcus* en présence d'ETMs. Ces différentes observations et expériences semblent aller dans le sens d'un effet plus fort des concentrations en ETMs mesurées dans la rade de Toulon que d'un enrichissement en nutriments pour *Synechococcus*.

VII.5.3.Utilisation de *Synechococcus* et des cyanobactéries comme bioindicateurs

À la vue de l'ensemble des résultats de cette thèse, l'utilisation du groupe *Synechococcus* (cyanobactérie) comme une espèce sentinelle polluosensible (appelée par la suite bioindicateur) apparait intéressant pour évaluer la qualité de l'eau à un instant donné dans la rade de Toulon et plus généralement dans les écosystèmes marins côtiers sous forte influence anthropique. Un bioindicateur est une espèce ou un groupe d'espèces qui permet selon ses traits biologiques et écologiques, l'indication précoce d'une modification de l'environnement. (Ham *et al.*, 1997). *Synechococcus* pourrait être un bon indicateur de perturbation car sa présence dans la colonne d'eau semble être liée à une bonne qualité de l'eau et notamment une faible concentration en ETM. La réponse rapide de l'abondance de *Synechococcus* après une contamination en ETMs ou une perturbation plus complexe comme une remise en

suspension de sédiments en fait d'autant plus un potentiel bioindicateur. Enfin, la caractérisation facile et rapide des cellules de *Synechococcus* par cytométrie en flux pourrait faciliter son utilisation comme bioindicateur pour évaluer de façon rapide et efficace la qualité de l'eau. Il est nécessaire tout de même de prendre en compte le fait que ce soit un microorganisme qui peut se développer très rapidement, notamment dans des zones contaminées. Ces variations d'abondance « classiques » généralement saisonnières nécessiteraient un suivi régulier et comparer à un site de référence. Il existe seulement une étude qui fait état de l'utilisation des picocyanobactéries (dont *Synechococcus*) comme bioindicateurs pour évaluer la contamination métallique des lacs alpins (Weisse and Mindl, 2002). L'utilisation de microorganismes autotrophes tels que les diatomées comme bioindicateurs a déjà été décrite. Ainsi, l'indice diatomique (abondance et diversité des diatomées au sein des communautés microbiennes) peut être utilisée comme un bioindicateur efficace de la qualité de l'eau de rivières ou de zones côtières marines (Rimet and Bouchez, 2011; Kermarrec *et al.*, 2014). L'indice biologique diatomées (IBD) utilise 209 taxa repères qui permet de classer l'eau selon différents états écologiques (de très bon état à très mauvais état). Toutefois, l'utilisation de cet indice est très chronophage et nécessite une grande expertise pour l'identification des diatomées en microscopie. L'utilisation de *Synechococcus* comme bioindicateur pourrait être plus facile mais n'apporterait sans doute pas la même résolution que l'IBD.

Généralement les diatomées sont collectées dans des biofilms ou périphyton pour réaliser un IBD (Leguay *et al.*, 2016). Les biofilms ont l'avantage d'être intégrateurs, c'est-à-dire que tout au long de leur vie, ils vont subir les variations de conditions environnementales et être composés de groupes microbiens qui reflètent ces variations. Ainsi, l'utilisation des biofilms comme bioindicateurs permettrait d'intégrer les changements de conditions environnementales sur une durée déterminée, plus représentative qu'un prélèvement discret dans une colonne d'eau hétérogène. Au cours de cette thèse, la structure microbienne de biofilms soumis à un stress cuprique a été observée par microscopie confocale durant un mois. Cette analyse a montré que les biofilms soumis à un stress cuprique ou les biofilms des zones très contaminées avaient une proportion de cyanobactéries filamenteuses plus élevée (Figure VII-7B, C, D) que les biofilms non soumis à un stress métallique (Figure VII-7A). Bien que le suivi et l'étude de cette matrice reste à développer et à rendre plus accessible, la prise en

compte des cyanobactéries filamenteuses comme bioindicateurs pourrait être une alternative à l'utilisation de *Synechococcus* en zone côtière

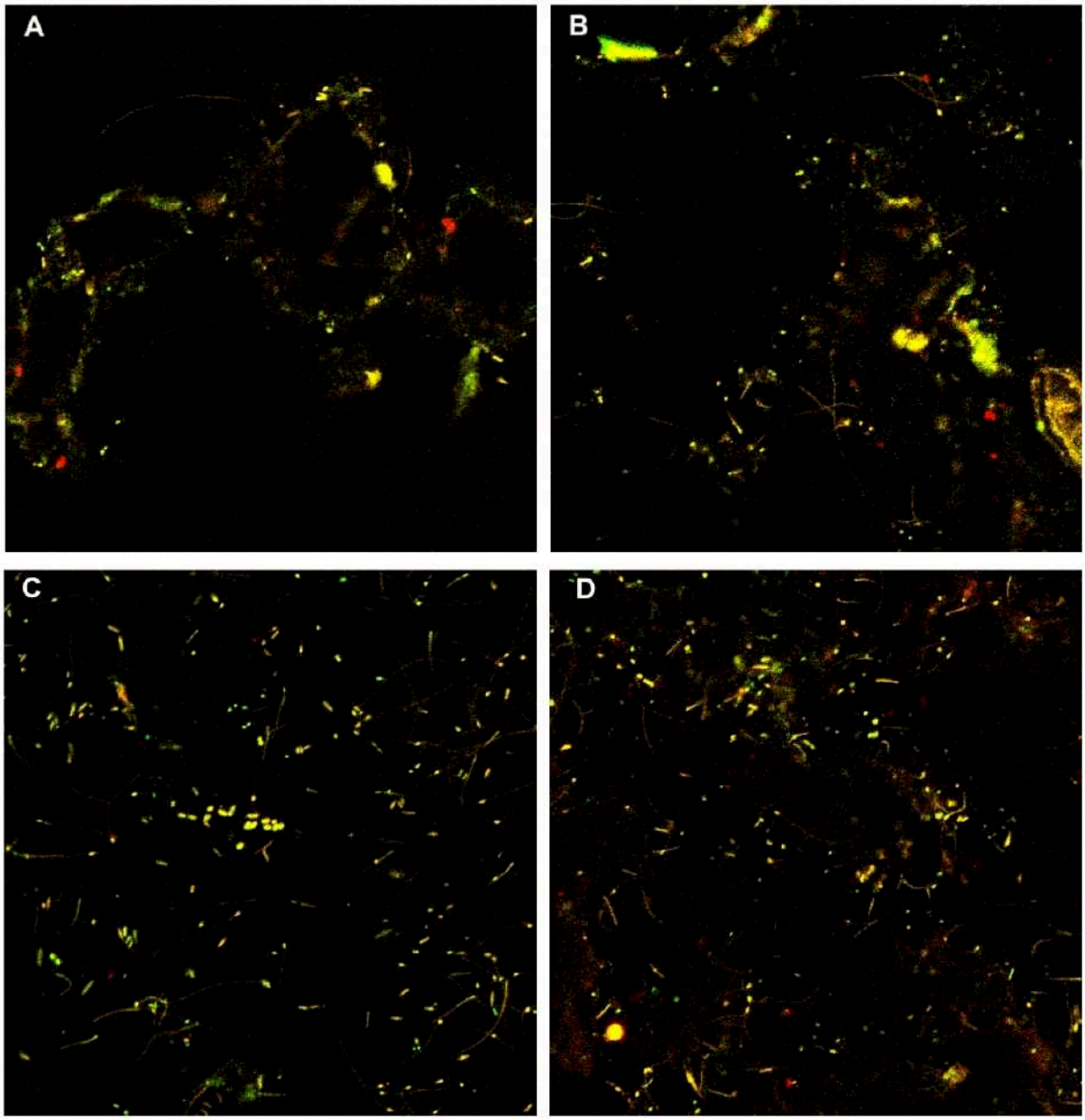


Figure VII-7 Structure des biofilms après 1 mois d'immersion dans une eau moyennement contaminée LAZ (A et B) et une eau très contaminée 6ext (C et D) sans ajout de Cu (A et C) ou avec un ajout de Cu pour atteindre 150nM, valeur haute pour la rade de Toulon (B et D). Jaune : cyanobactéries ; Vert : cellules eucaryotes autotrophes ; Rouge : cellules procaryotes hétérotrophes.

CHAPITRE VIII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

VIII.1. Conclusions générales de la thèse

Ce travail de thèse a permis des avancées importantes sur la connaissance de l'impact des ETMs sur les communautés microbiennes dans un environnement marin côtier soumis à d'importantes pressions anthropiques comme la rade de Toulon.

Tout d'abord, une étude géochimique approfondie de la colonne d'eau de la rade de Toulon a été réalisée au cours de cette thèse. Des gradients de contamination multiples et forts ont été mis en évidence, avec des concentrations totales, dissoutes et labiles en Cd, Cu, Pb et Zn notamment très faibles dans les zones ouvertes vers le large et maximales (plusieurs dizaines de nM de plus que le bruit de fond géochimique de la Méditerranée) dans les zones enclavées du nord de la petite rade. Des variations spatiales localisées ont aussi été mises en évidence. Les concentrations en Cu étaient généralement plus importantes en surface et proches des ports alors que les concentrations en Pb étaient plus importantes au fond de la colonne d'eau proche des sédiments ou des zones militaires. Enfin, les gradients de contamination étaient stables sur plusieurs années, avec des variations saisonnières ou ponctuelles dues à l'augmentation de certaines activités, à des travaux de dragage et aux conditions climatiques et environnementales.

Le deuxième objectif était l'étude des communautés ultraphytoplanctoniques de la rade de Toulon en lien avec les gradients multiples de contamination en ETMs. Une forte structuration spatiale des communautés ultraphytoplanctoniques en lien avec les gradients de contamination en ETMs a été observée dans la rade de Toulon. Les réponses (résistance et résilience) différentes selon les groupes ultraphytoplanctoniques ont conduit à des gradients biologiques similaires (Picoeucaryotes) ou inverses (*Synechococcus*-like) aux gradients de contamination. Des variations temporelles saisonnières et des variations ponctuelles de la structuration spatiale des communautés ultraphytoplanctoniques ont aussi été mises en évidence. Cependant, ces variations saisonnières n'empêchaient pas la forte structuration spatiale des communautés le long des gradients de contamination en ETMs dans la rade de Toulon. La modification des conditions physico-chimiques liée à des opérations de dragage a renforcée cette structuration durant une période de temps limité. Enfin, le Cu est apparu plus toxique que le Pb pour les communautés ultraphytoplanctoniques. Cela a pu s'expliquer par

des mécanismes de résistance au Pb sélectionnés par la contamination chronique du Pb dans la rade de Toulon.

Le troisième objectif était l'étude des communautés de bactérioplancton de la rade de Toulon en lien avec les gradients multiples de contamination en ETMs. Comme pour les communautés ultraphytoplanctonique, une structuration spatiale de la composition des communautés de bactérioplancton le long du gradient multiple de contamination en ETM a été observée. Cette structuration spatiale est apparue stable dans le temps. Les ETMs ont pu avoir une influence directe et indirecte sur les communautés de bactérioplancton. L'influence directe de la contamination en ETMs à était la résultante des mécanismes de toxicité de certains ETMs qui ont entrainé des changements de composition des communautés. Ainsi, dans les zones contaminées, une augmentation des taxa résistants et diminution des taxa sensibles au sein des communautés de bactérioplancton a été observée. L'influence indirecte de la contamination en ETMs est principalement expliquée par le couplage bactérioplancton-phytoplancton qui a favorisé la croissance du bactérioplancton. De plus, l'effet toxique des ETMs sur l'ultraphytoplancton démontré précédemment a pu libérer de la MOD et ainsi favoriser des organismes copiotrophes et des taxons plus compétitifs, d'une manière générale. Finalement, le Cu est apparu comme un des ETMs les plus structurant pour les communautés de bactérioplancton.

Enfin, le dernier objectif de cette thèse a consisté à étudier les communautés de procaryotes dans les biofilms de la rade de Toulon. La composition des communautés de procaryotes dans les biofilms n'était pas structurée de façon évidente le long du gradient multiple de contamination en ETMs dans la rade de Toulon. En revanche, une structuration forte des communautés le long de la colonne d'eau a été mise en évidence, avec une composition très différente entre les biofilms de surface et les biofilms de fond. C'est la première fois au cours de cette thèse qu'un rôle nuancé du gradient de contamination sur des communautés microbiennes a été observé. La faible influence du gradient multiple de contamination en ETMs de la colonne d'eau sur les communautés de procaryotes des biofilms a tout d'abord mis en lumière les capacités de résistance du biofilm face à une perturbation. L'absence de relation forte avec le compartiment planctonique a aussi pu expliquer la faible structuration spatiale le long du gradient multiple de contamination aux ETMs. Enfin, le rôle majeur des sédiments dans la formation et l'établissement d'un biofilm microbien a été montré. La différenciation des communautés de biofilms de surface et de fond a pu s'expliquer

d'une part par la présence d'organismes dans les sédiments capables de coloniser une surface immergée. D'autre part, la remise en suspension de sédiments contaminés a aussi pu entrainer une sélection de groupes taxonomiques résistants dans les biofilms du fond par rapport aux biofilms de surface.

VIII.2. Perspectives

Ce travail de thèse a ouvert un certain nombre de perspectives qui s'inscrivent dans la continuité directe des résultats obtenus.

VIII.2.1. Caractériser d'autres types de perturbation dans la rade de Toulon

Au cours de cette thèse, une étude détaillée des conditions environnementales de la colonne d'eau de la rade de Toulon a été réalisée. L'analyse de 25 ETMs et des conditions physico-chimiques a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des ETMs pour expliquer la structure des communautés microbiennes dans la rade de Toulon. Toutefois, cette étude a aussi montré que les ETMs n'expliquaient pas la totalité de la variabilité biologique dans la rade de Toulon. D'autres phénomènes sont donc responsables de ces variations. La contamination aux ETMs dans les milieux côtiers est souvent associée à des contaminations organiques (HAP, PCP, pesticides) (Rigaud *et al.*, 2013; Jeanbille *et al.*, 2016), notamment dans les sédiments de la rade de Toulon (Misson *et al.*, 2016; Wafo *et al.*, 2016). La contamination en HAP a déjà été montrée comme potentiellement structurante pour les communautés microbiennes (Jeanbille *et al.*, 2016; Ben Othman *et al.*, 2017; Milan *et al.*, 2018). Enfin, la co-occurrence de deux perturbations peut avoir des effets additifs, synergiques ou antagonistes. Ainsi caractériser d'autres sources de contamination dans la rade de Toulon pourra permettre de mieux comprendre le rôle des ETM sur les communautés microbiennes.

VIII.2.2. Améliorer l'étude de la diversité des communautés ultraplanctoniques

Ces travaux de thèse ont permis de d'étudier pour la première fois la diversité des communautés de bactérioplancton dans la rade de Toulon. L'utilisation de techniques de

métabarcoding et d'outils de bioinformatiques ont contribué à une meilleure description de ce compartiment et des relations avec les communautés ultraphytoplanctoniques et les ETMs, notamment. Toutefois, l'utilisation d'amorces généralistes du gène codant pour l'ADN ribosomique 16S n'a pas permis d'étudier la diversité des archées de manière précise. Souvent peu représenté dans nos résultats de séquençages, les archées ont souvent été considérées comme une sous-communauté « rare » (< 1% des séquences totales). Ainsi, la description des variations spatio-temporelles de ce groupe dans la rade de Toulon n'a pas été approfondie. Il apparaît alors intéressant d'utiliser des amorces spécifiques des archées afin de les intégrer au mieux dans nos futures analyses et d'avoir une représentation plus réaliste de leur contribution dans les communautés microbiennes.

Des liens forts entre les communautés ultraphytoplanctoniques et bactérioplanctoniques dans la rade de Toulon ont été mis en évidence. Or, les communautés ultraphytoplanctoniques n'ont été analysées durant cette thèse qu'au moyen de la cytométrie en flux. Afin d'avoir une meilleure vision de l'importance et de la nature de ces relations, l'étude de la diversité génétique de l'ultraphytoplancton apparait intéressante. Dans ce sens, une étude de la diversité génétique de ce compartiment est actuellement en cours à partir d'échantillons prélevés lors du suivi mensuel présenté dans cette thèse.

VIII.2.3. Approfondir l'étude des communautés de biofilm de cette étude

Cette thèse a été le point de départ d'une étude novatrice dans le domaine des communautés microbiennes de biofilm. En effet, même si quelques études ont déjà été réalisées (Briand *et al.*, 2012, 2017; Pollet *et al.*, 2018), c'est l'une des toutes premières études sur la variabilité de la diversité génétique des biofilms naturels marins dans la rade de Toulon. C'est aussi la première étude visant à comprendre le rôle spécifique d'une contamination multiple en ETMs sur l'établissement d'un biofilm complexe en milieu marin côtier.

Toutefois, un grand nombre de données acquises durant cette thèse n'ont pas encore été traitées, analysées et présentées. Ainsi, l'étude en mésocosme décrite dans l'article 5 a aussi concerné les communautés de biofilm afin d'étudier les effets spécifiques du Cu et du Pb sur les communautés de biofilm ainsi que le rôle de l'historique de contamination en ETMs sur l'établissement d'un biofilm après une nouvelle perturbation. Pour tenter de répondre à ces objectifs, des biofilms ont été prélevés après environ un mois d'expérience dans chaque

condition, comme déjà présentée dans l'article 5. Ces échantillons ont été envoyés pour une analyse de métabarcoding et les données seront analysées prochainement.

Dans le but d'étudier la formation d'un biofilm microbien marin avec une approche expérimentale complémentaire, des plaques ont aussi été immergées lors de l'expérience en mésocosme, prélevées chaque semaine, et fixées puis marquées aux SyberGreen pour une analyse par microscopie confocal à balayage laser (CLSM). L'analyse en CLSM a permis de caractériser 3 groupes microbiens : les organismes eucaryotes autotrophes, les organismes procaryotes autotrophes et hétérotrophes selon leurs propriétés de fluorescence. Ainsi, les organismes autotrophes ont été détectés grâce à leurs propriétés autofluorescentes et les organismes hétérotrophes grâce au SyberGreen, un fluorochrome se fixant à l'ADN. C'est une des toutes premières études visant à caractériser un biofilm complexe et naturel par cette technique. L'objectif est d'avoir une représentation spatiale plus précise du développement des groupes identifiées durant la formation d'un biofilm. Cette analyse fournira aussi des données de pourcentage de recouvrement et de biovolume en fonction des différentes conditions étudiées.

VIII.2.4. Prendre en compte le compartiment sédimentaire

Enfin, au cours de cette thèse, le compartiment sédimentaire a joué un rôle majeur dans la contamination de la colonne et dans la structuration des communautés microbiennes. Les processus de remise en suspension entraînent généralement une augmentation des concentrations en ETMs dans la colonne d'eau. La remise en suspension peut aussi modifier la structure des biofilms le long de la colonne d'eau par la présence de microorganismes benthiques ayant des capacités de formation de biofilm supérieure à celle des microorganismes planctoniques. A ce jour, seule une étude a caractérisé les communautés microbiennes dans les sédiments de la rade de Toulon (Misson *et al.*, 2016). Ainsi, une analyse de la diversité génétique de ce compartiment est actuellement en cours afin de permettre une meilleure compréhension de l'effet des ETMs sur les communautés benthiques. L'étude de l'ensemble des compartiments microbiens (*i.e.* planctonique, biofilm et benthique) permettra une meilleure compréhension des écosystèmes marins côtiers fortement anthropisés et tentera de faire la lumière de façon précise sur les processus biotiques et abiotiques en lien avec une contamination en ETMs importante.

ANNEXE A. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 1

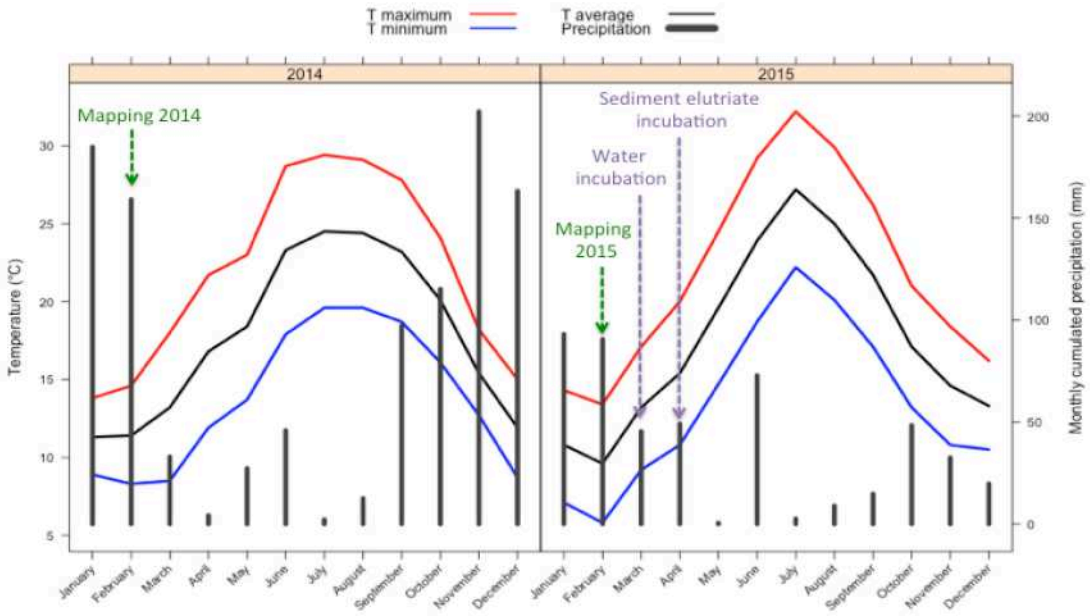


Figure A- 1 Monthly average temperature (°C) and monthly-cumulated precipitation (mm) in 2014 and 2015.

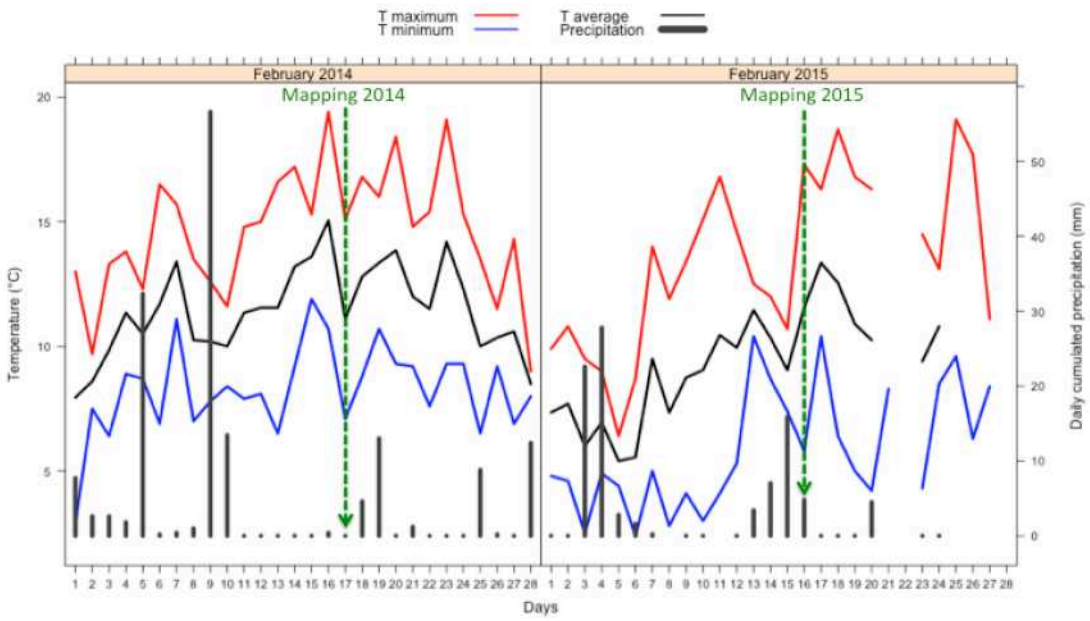


Figure A- 2 Daily average temperature (°C) and daily cumulated precipitation (mm) in February 2014 and February 2015.

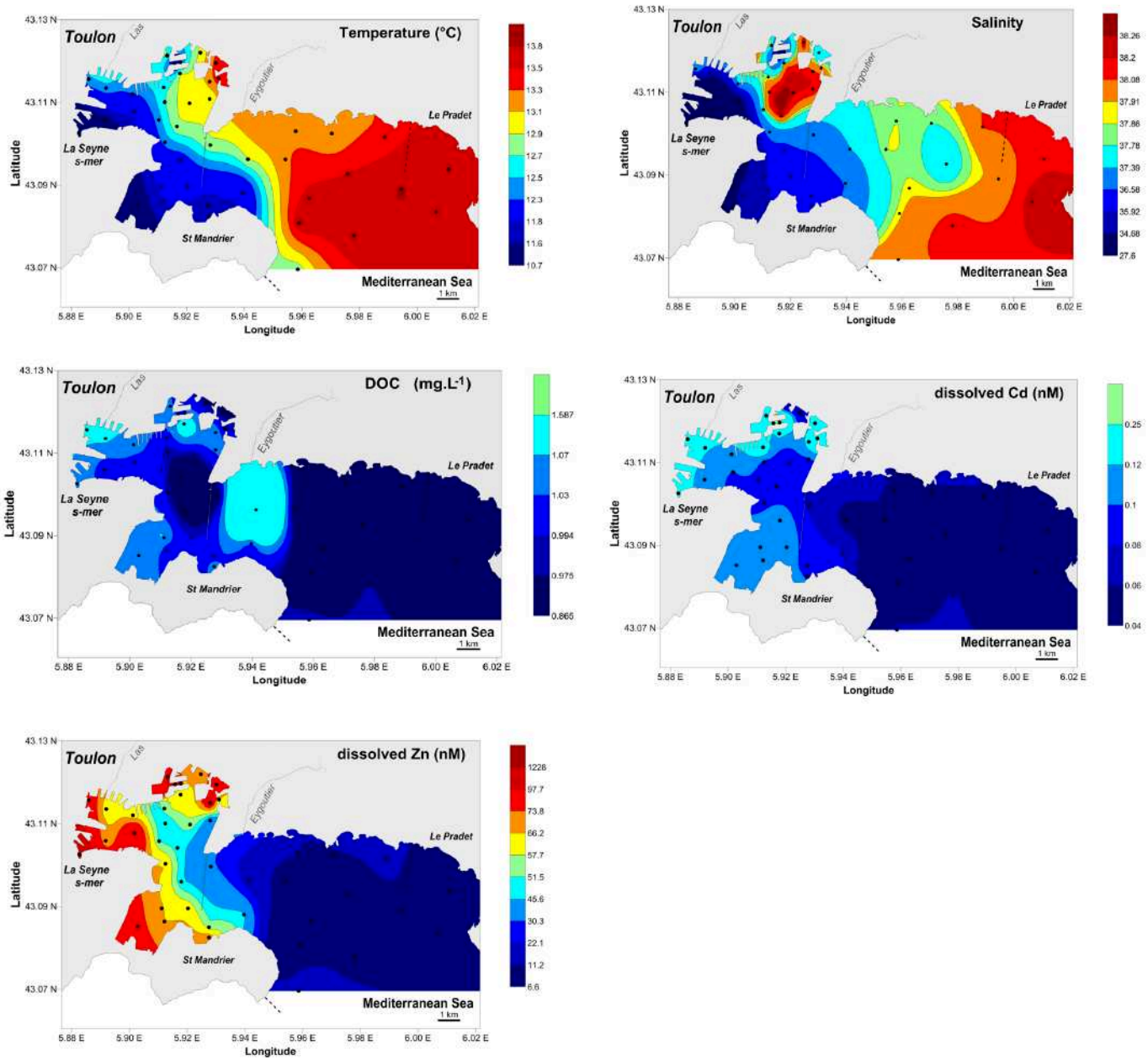


Figure A- 3 Examples of abiotic parameters spatial variations in surface seawater of Toulon Bay in February 2015. For temperature and salinity, colour scales were drawn according to deciles of the respective datasets. For DOC and Cd, given the very low amplitude of variability observed, a smaller colour code was employed. For each parameter, the smallest and highest numbers of the colour scale represented the smallest and highest values measured, respectively.

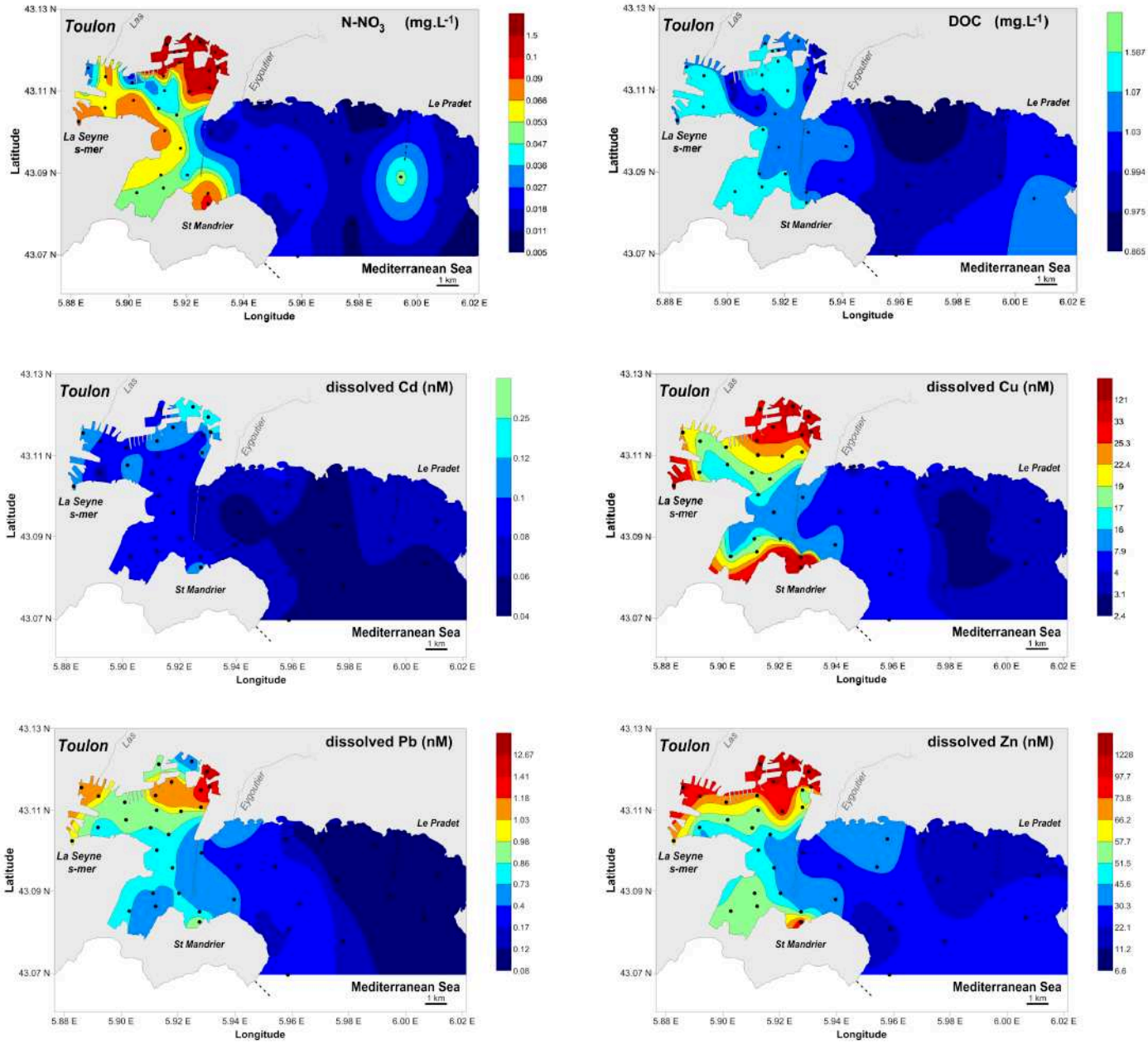


Figure A- 4 Examples of abiotic parameters spatial variations in surface seawater of Toulon Bay in February 2014. For temperature and salinity, colour scales were drawn according to deciles of the respective datasets. For DOC and Cd, given the very low amplitude of variability observed, a smaller colour code was employed. For each parameter, the smallest and highest numbers of the colour scale represented the smallest and highest values measured, respectively.

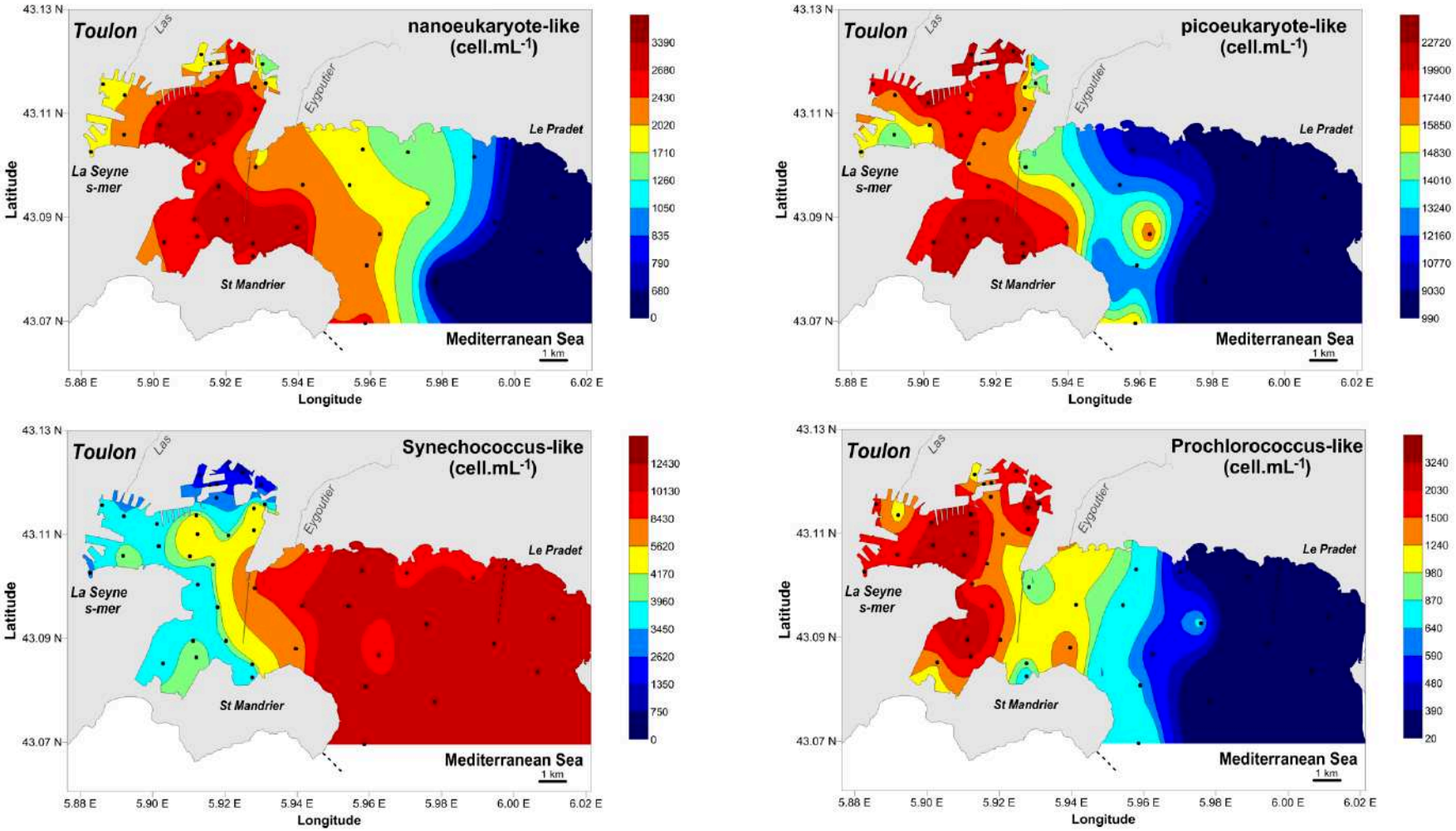


Figure A- 5 Spatial distributions of ultraphytoplanktonic groups in surface seawater of Toulon bay in February 2014, calculated from flow cytometry data. A: N-Eu, B: P-Eu, C: SYN, D: PRO. Values are expressed in cell.mL-1. Scales were drawn according to deciles of the respective datasets

A.1. Presentation of an additional condition set for the water incubation.

In order to assess the impacts of nitrate on ultraphytoplanktonic community, an additional condition was performed at the same time than water incubation (from March 3rd to March 27th, 2015; 24 days). A volume of 0.5 L of 10 µm pre-filtered 41p water and 0.5 L of 0.2 µm pre-filtered 41p were poured into each NO_3^- condition replicates. Each replicate was artificially enriched with 41 µM of NO_3^- (0.57 mg N L^{-1}). NO_3^- concentration added in the incubation was determined from maximal values observed during the mapping 2014, which reached 1.5 mg N L^{-1}. So final NO_3^- concentration in each replicate was two-fold lower than in the most concentrated sites of Toulon Bay. All analyses describe in sections 2.6 and 2.7 were also performed for this condition.

After water mixing, DOC concentration and all metal concentrations were similar to concentration in initial 41p water. Nitrate concentration was higher than in initial 41p water and relatively similar to NO_3^- concentration adding before water mixing (0.5 mg N L^{-1}).

The dynamics of total ultraphytoplankton was very similar to what observed in condition A (Figure A- 5A). Indeed, total ultraphytoplankton abundance increased regularly and more than 17-fold along the 24 days of incubation, from $9.0 \pm 0.2 \times 10^3$ to $1.5 \pm 0.4 \times 10^5$ cells.mL^{-1}. This increase was mainly due to *SYN* increase (34-fold). At the beginning of the experiment, the structure of ultraphytoplankton was very similar to condition A (Figure A- 6), with a co-dominance of *SYN* (49.6%) and *P-Eu* (31.5%). Once again, at the end of the experiment, the structure of ultraphytoplankton was very similar from condition A, with a large dominance of *SYN* (94.0%).

Nitrate addition did not induce both abundance and structure modification compared to uncontaminated water control condition. This result suggests that nitrate might only contribute in a minor extent to the ultraphytoplankton abundance and structure variations induced in condition B (metals + nitrate addition).

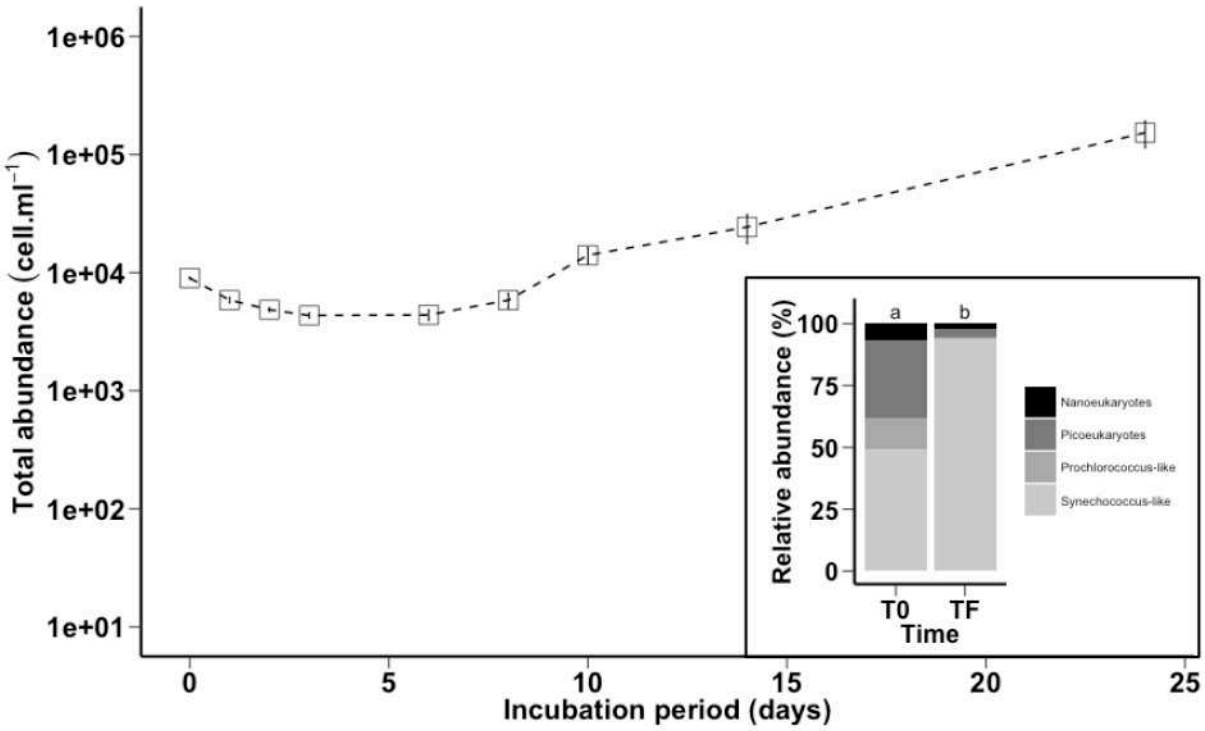


Figure A- 6 Total abundance of ultraphytoplankton dynamic in nitrate condition during the water incubation experiment. Symbols and errors bars represent average and standard deviation on replicates, respectively. Ultraphytoplankton community structure in the nitrate condition at the beginning and the end of water incubation experiment. Different lower-case letters indicate significant difference between compared community structures.

Tableau A- 1 Chemical characteristics of sampled seawater at the beginning and the end of both water mixing incubation and sediment elutriate incubation for each condition.

Incubation	Condition	Mixture	Time	DOC (mg C L^{-1})	TN (mg N L^{-1})	N-NO_3^- (mg N L^{-1})	Dissolved Cd (nM)	Dissolved Cu (nM)	Dissolved Pb (nM)	Dissolved Zn (nM)*
Water incubation	**41p**			0.97 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01	4.3 ± 0.4	0.24 ± 0.03	NA
	MIS			0.94 ± 0.06	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.00	0.10 ± 0.02	27 ± 1	0.83 ± 0.06	NA
	A	41p / 41p	T0	1.2 ± 0.1	1.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.05	4.4 ± 0.2	0.28 ± 0.02	NA
			END	1.9 ± 0.1	0.55 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.01	4.4 ± 0.4	0.25 ± 0.02	NA
	B	41p / 41p + Metals	T0	1.1 ± 0.1	0.74 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.12 ± 0.02	44 ± 4	3.3 ± 0.2	NA
			END	1.7 ± 0.1	0.32 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	36 ± 4	3.0 ± 0.3	NA
	C	41p / 41p + Metals + NO_3^-	T0	1.3 ± 0.1	1.08 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.09 ± 0.02	41 ± 5	3.3 ± 0.2	NA
			END	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.51 ± 0.03	0.08 ± 0.02	38 ± 2	2.8 ± 0.1	NA
	D	41p / MIS	T0	1.1 ± 0.1	0.36 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.10 ± 0.01	16 ± 1	0.76 ± 0.04	NA
			END	1.7 ± 0.1	0.68 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.02	10 ± 2	0.54 ± 0.05	NA
	E	MIS / MIS	T0	1.3 ± 0.1	0.49 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.12 ± 0.02	24 ± 4	1.01 ± 0.07	NA
			END	1.9 ± 0.1	0.79 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.09 ± 0.02	20 ± 1	0.78 ± 0.05	NA
Sediment elutriate incubation	**41p**			1.0 ± 0.1	0.06 ± 0.01	< DL	0.06 ± 0.01	3.2 ± 0.2	0.14 ± 0.01	8.8 ± 0.5
	MIS			0.97 ± 0.02	1.2 ± 0.1	1.06 ± 0.00	0.12 ± 0.04	131 ± 18	1.3 ± 0.1	170 ± 10

Elutriate			0.95 ± 0.02	1.1 ± 0.1	0.87 ± 0.00	0.36 ± 0.04	30 ± 2	5.3 ± 0.6	208 ± 15
F	41p / 41p	T0	0.88 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.01	3.1 ± 0.2	0.11 ± 0.01	8.2 ± 0.7
		END	1.1 ± 0.1	0.11 ± 0.01	< DL	0.07 ± 0.01	3.1 ± 0.2	0.08 ± 0.01	5.8 ± 0.4
G	41p / Elutriate	T0	0.94 ± 0.03	0.82 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.30 ± 0.03	18 ± 1	2.8 ± 0.1	121 ± 9
		END	2.3 ± 0.1	0.50 ± 0.02	0.44 ± 0.06	0.25 ± 0.03	16 ± 1	2.2 ± 0.1	128 ± 11
H	41p / 41p + Metals	T0	0.90 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.38 ± 0.04	22 ± 2	3.7 ± 0.3	118 ± 8
		END	1.3 ± 0.1	0.30 ± 0.00	0.27 ± 0.05	0.26 ± 0.03	16 ± 1	2.8 ± 0.2	130 ± 9

NA: not analyzed, DL: detection limit

* Zn concentrations were not determined for water incubation experiment due to Zn contamination from filters

ANNEXE B. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 2

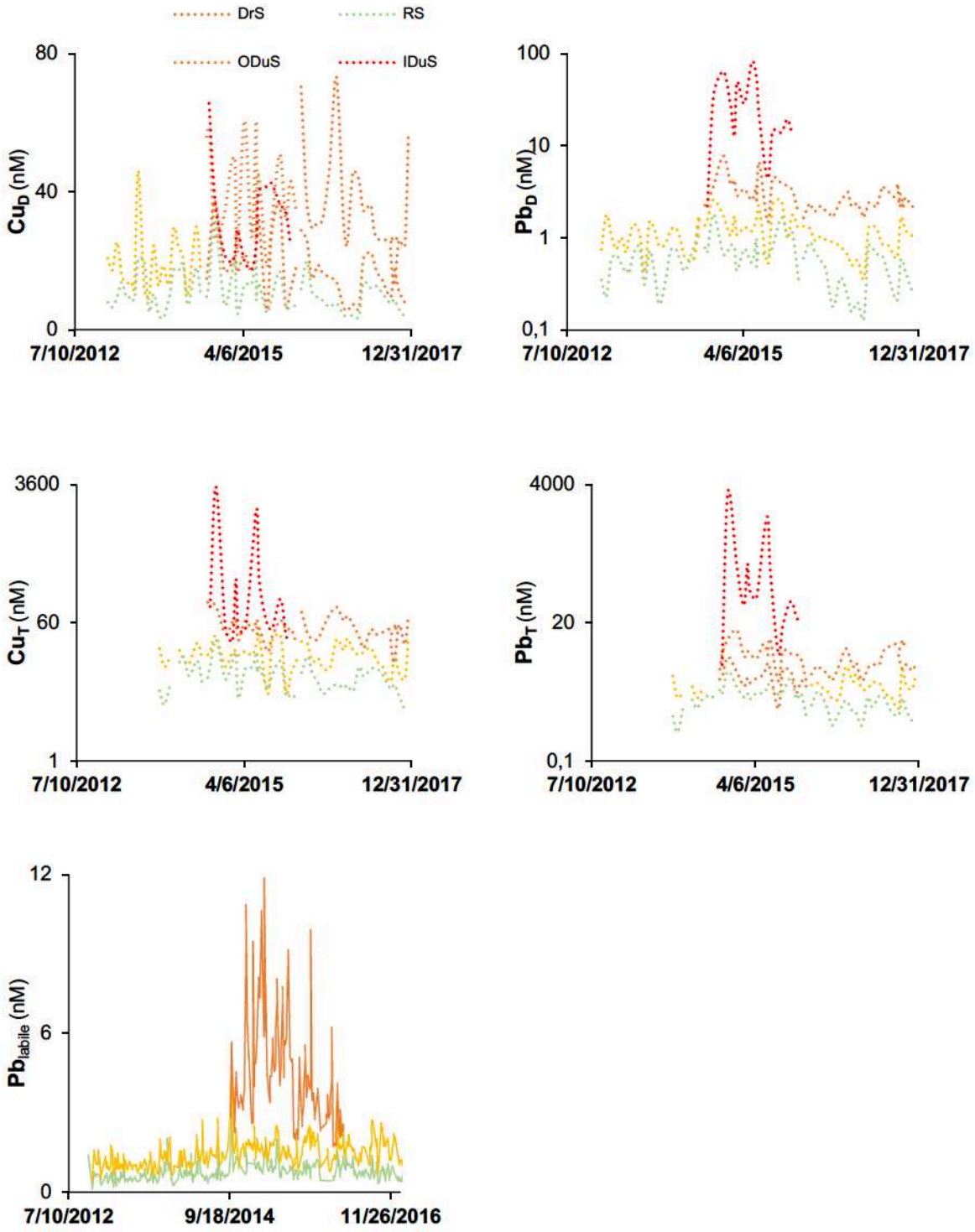


Figure B- 1 Spatial and temporal variation of of Cu and Pb concentrations during the long-term monitoring.

ANNEXE C. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 3

C.1. Supplementary materials

C.1.1. Environmental parameters

A description of the pre-cleaning protocol, the storage and the measurement of nutrients (dissolved organic carbon: DOC (mg C L^{-1}), total nitrogen: TN, and nitrate: NO_3^- (mg N L^{-1}) and dissolved trace metal (Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn) (nM) concentrations is detailed in Coclet *et al.* (2018). Additionally, Trace metal concentrations in seawater samples were analyzed also by HR ICP-MS (Element 2, Thermo Finnigan; at IRB, Zagreb). Measurements were performed after dilution of the samples in a 2 % HNO_3 solution (dilution factor 10) spiked with a stock solution of indium as an internal standard (final concentration: 10 µg.L^{-1}). Standards of elements were prepared in the matrix matching media (UWSV, 2 % HNO_3) for the assessment of element concentration by means of external calibration. Phosphate concentrations (PO_4^{3-}, mg P L^{-1}) were determined using a UV 1800 Shimadzu Spectrophotometer and micro cell Quartz SUPRASIL®, 50-mm light path (Hellma Analytics), based on the Rimmelin and Moutin (2005) MAGnesium Induced Coprecipitation (MAGIC) method.

C.1.2. DNA extraction, PCR amplification and sequencing preparation.

Nucleic acids were extracted by a combination of mechanic and enzymatic cell lysis techniques applied directly to polycarbonate membrane filters using lysis solution (50 nM glucose, 10 nM EDTA, 25 nM Tris pH 8.0), followed by consecutive incubations with lysozyme (20 mg.mL^{-1}, 37°C, 45 min) and SDS 10% with proteinase K (20 mg.mL^{-1}, 55°C, 60 min). DNA was purified using AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions (Ghiglione et al., 2009). DNA concentration was measured using a NanoDrop ND-100.

Microbial communities were characterized using a dual index sequencing approach with primers targeting the V4 region of the bacterial and archaeal 16S rRNA genes. The primer construct consisted of a six-base barcode and the 16S forward primer 515Y (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) and the 16S reverse 926R (CCGYCAATTYMTTTRAGTTT) (Parada *et al.*, 2016). PCR reactions were carried out in a 25 µL reaction mixture composed of DNA sample, GoTaq® Long PCR Master Mix (PROMEGA, France), and 0.1 µM of each primer. PCR

reactions were thermo-cycled using the following protocol: 95 °C for 2 min; and 30 cycles at 95 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 72 ° C for 90 s; with a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were then purified with AMPure XP beads (Agencourt Bioscience) and quantified by Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent (Life Technologies) as described by the manufacturer's instructions. Purified products from samples were pooled in equimolar concentrations. In total, 52 libraries were paired-end (2 × 250bp) sequenced on the MiSeq (Illumina) at Genoscreen (Lille, France).

C.1.3. Redundancy analysis

To investigate the overall effects of abiotic parameters on BCC, we performed Spearman rank correlation analysis and redundancy analysis (RDA) of the relative taxon abundances as well as of the relative functional group abundances, against 31 explanatory variables: temperature, salinity, chlorophyll *a*, DOC, TN (Figure C- 4), dissolved oxygen ($mg.L^{-1}$ and %), pH, eukaryotic phytoplankton (pico- and nanoeukaryotes) abundances (Table C- 2), dissolved Cd, Cu, Pb and Zn (Figure C- 2), and the 17 chemical elements from Table C- 2. Prior to the RDA, the "ordiR2step" function in Vegan (Oksanen *et al.*, 2016) was used to automatically select constraints in the model using forward stepwise selection and Akaike's information criterion with 999 permutation tests at each step. We repeated the forward stepwise selection with the bacterial community from each sampling site. Among the 31 explanatory variables, 20 significant variables ($P < 0.05$) were kept for the following analyses. To evaluate the significance of the redundancy axes, we used an ANOVA test for RDA with Monte Carlo permutation test (999 permutations). Variation partitioning was used to evaluate whether pure trace metal variables affected the BCC independently of the effect of other variables (Oksanen *et al.*, 2016). In Dang, Lenoble, *et al.* (2015), the geochemical analysis of Toulon Bay revealed that three-main groups were clearly identified: (i) marine elements (with Sr, notably), (ii) contaminants and (iii) terrigenous elements. Based on this study, all significant explanatory variables were divided into four groups. Thus, firstly, we separated the 'pure contaminants' (A) effect as referring to the trace metals, Ba, Cd, Cu, Pb, Zn, Mn. Secondly, we separated "terrigenous elements" (B) (Li, Rb, Cs, Al and Fe) and "nutrient and biotic variables" (C) (DOC, TN, chlorophyll *a*, picoeukaryote and nanoeukaryote densities). Thirdly, we generated a set of

variables related to "other variables" as 'marine tracers" (D) (V, Sr, Temperature and Salinity). Each group of explanatory variables was tested independently as well as in combination. To verify the robustness of our results for various taxonomic resolutions, we considered the taxonomic composition at the OTU, genus, family, order, class and phylum level.

C.2. Supplementary figures

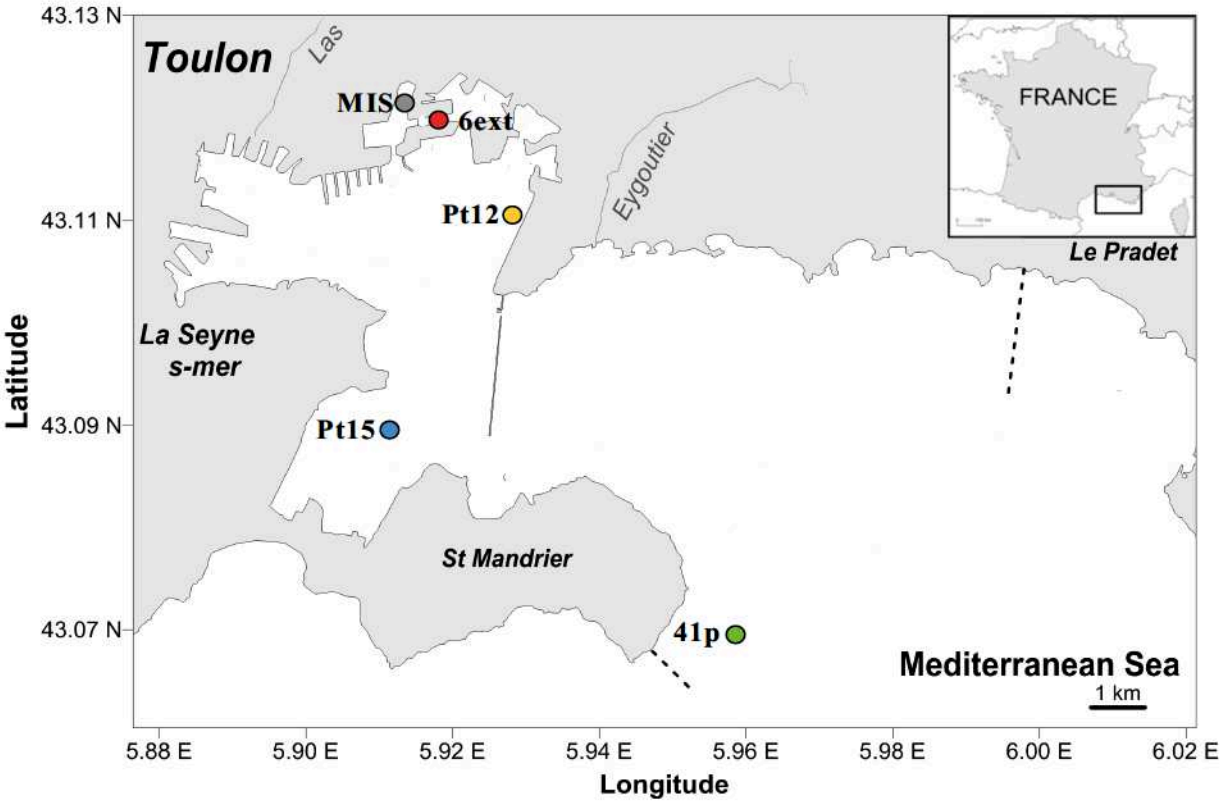


Figure C- 1 Map of the studied site Toulon Bay with the location of the sampling sites. Solid and dashed lines represent a seawall and treated sewage submarine outlets, respectively.

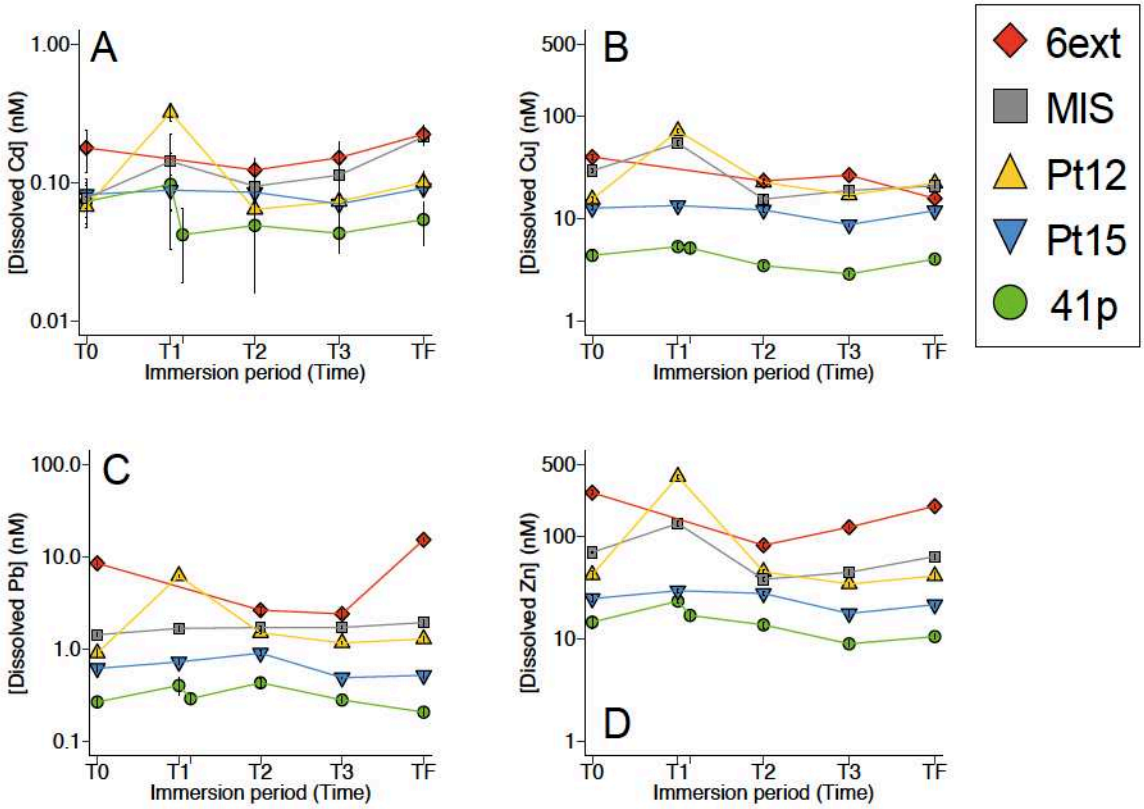


Figure C- 2 Dynamics of dissolved trace metals concentrations in bottom seawater at the different sampling sites. Symbols and errors bars represent average and standard error (n = 3), respectively.

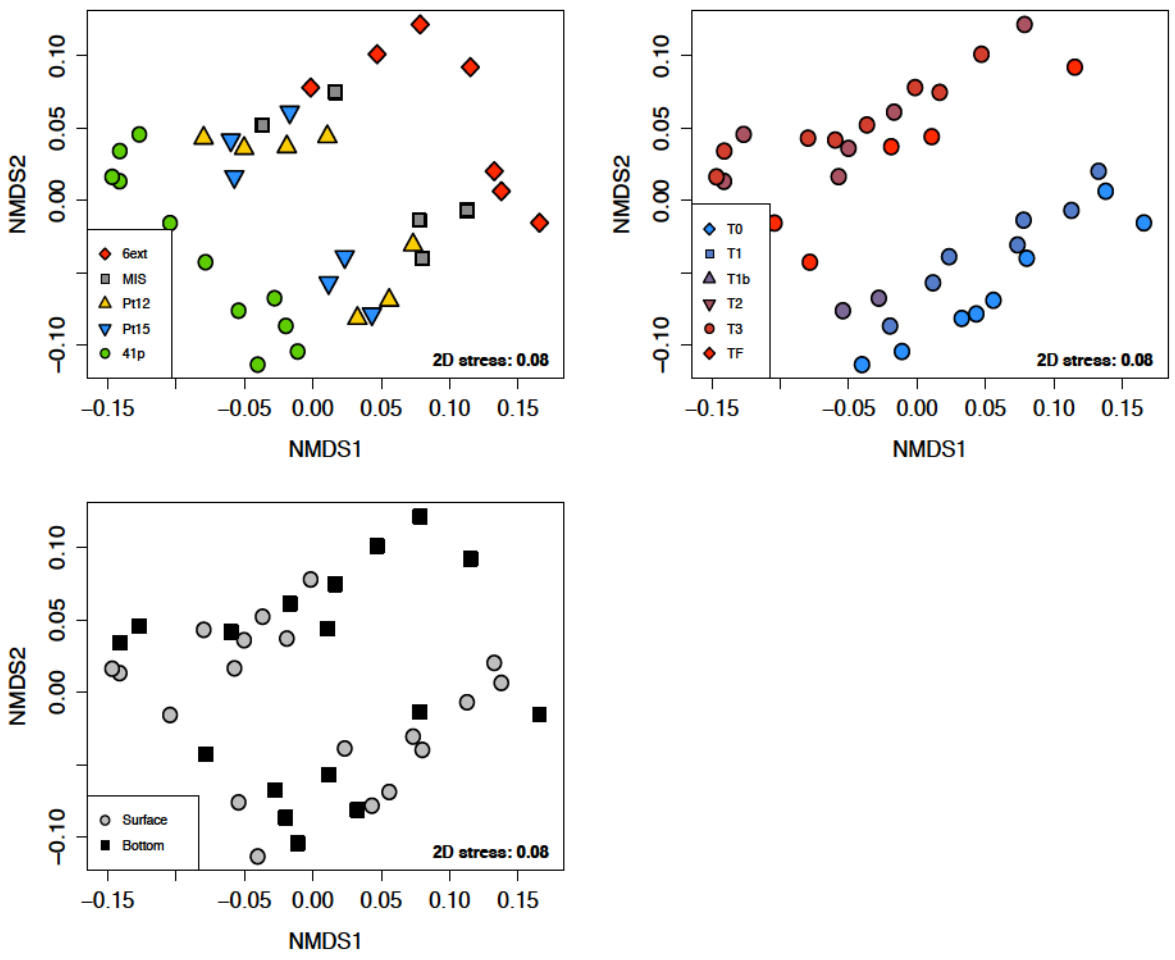
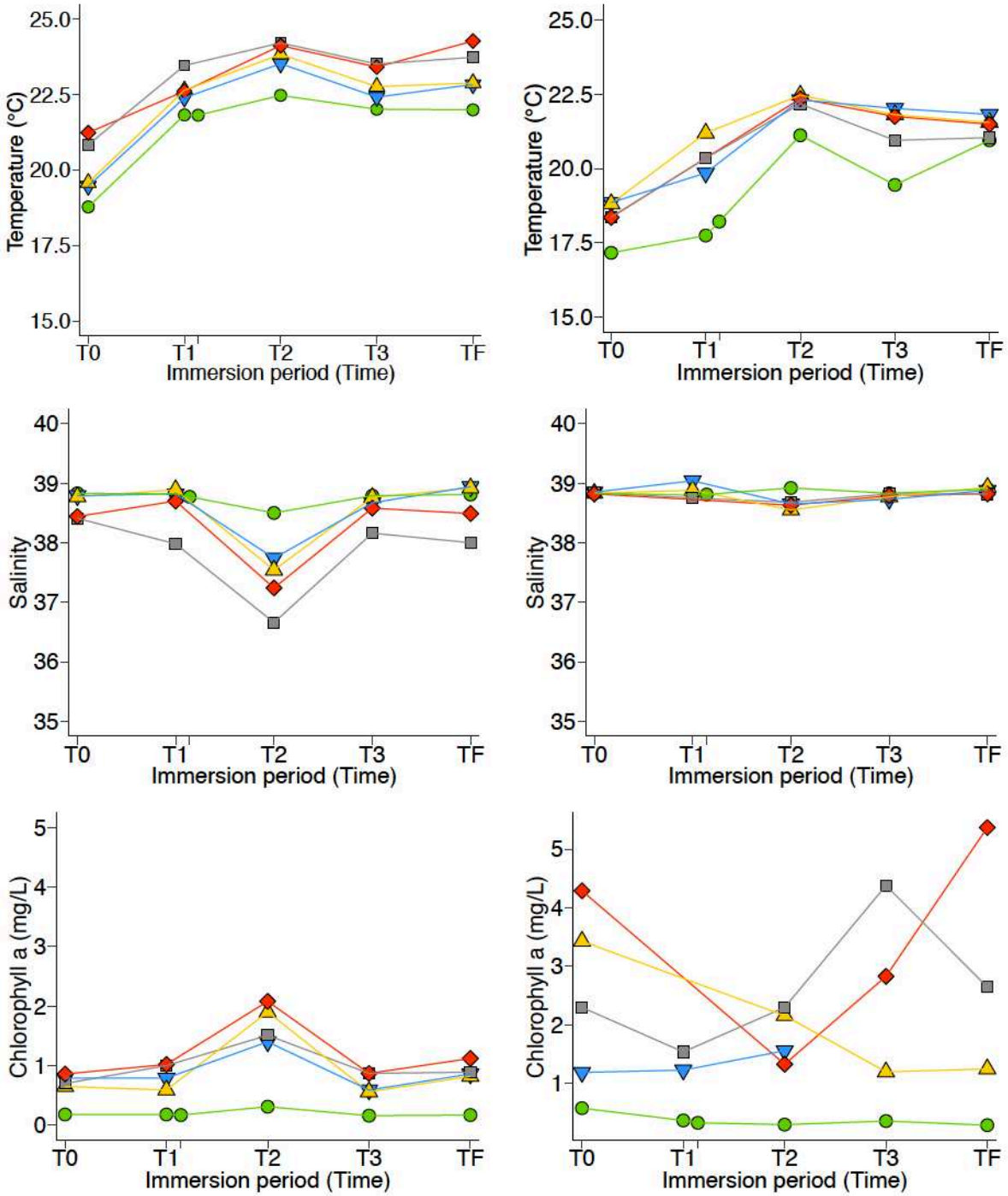


Figure C- 3 Nonmetric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray-Curtis dissimilarity for explanatory variables (temperature, salinity, chlorophyll a, DOC, TN, dissolved oxygen (mg.L-1 and %), pH, pico- and nanoeukaryotes abundances dissolved Cd, Cu, Pb and Zn, and the 17 chemical elements from Table S2) between the different sampling sites (A), sampling date (B), and sampling depth (C). Each symbol corresponds to a distinct site, time and depth point.


Temperature (°C)
25.0
22.5
20.0
17.5
15.0
T0
T1
T2
T3
TF
Immersion period (Time)
Salinity
40
39
38
37
36
35
Chlorophyll a (mg/L)
5
4
3
2
1
0

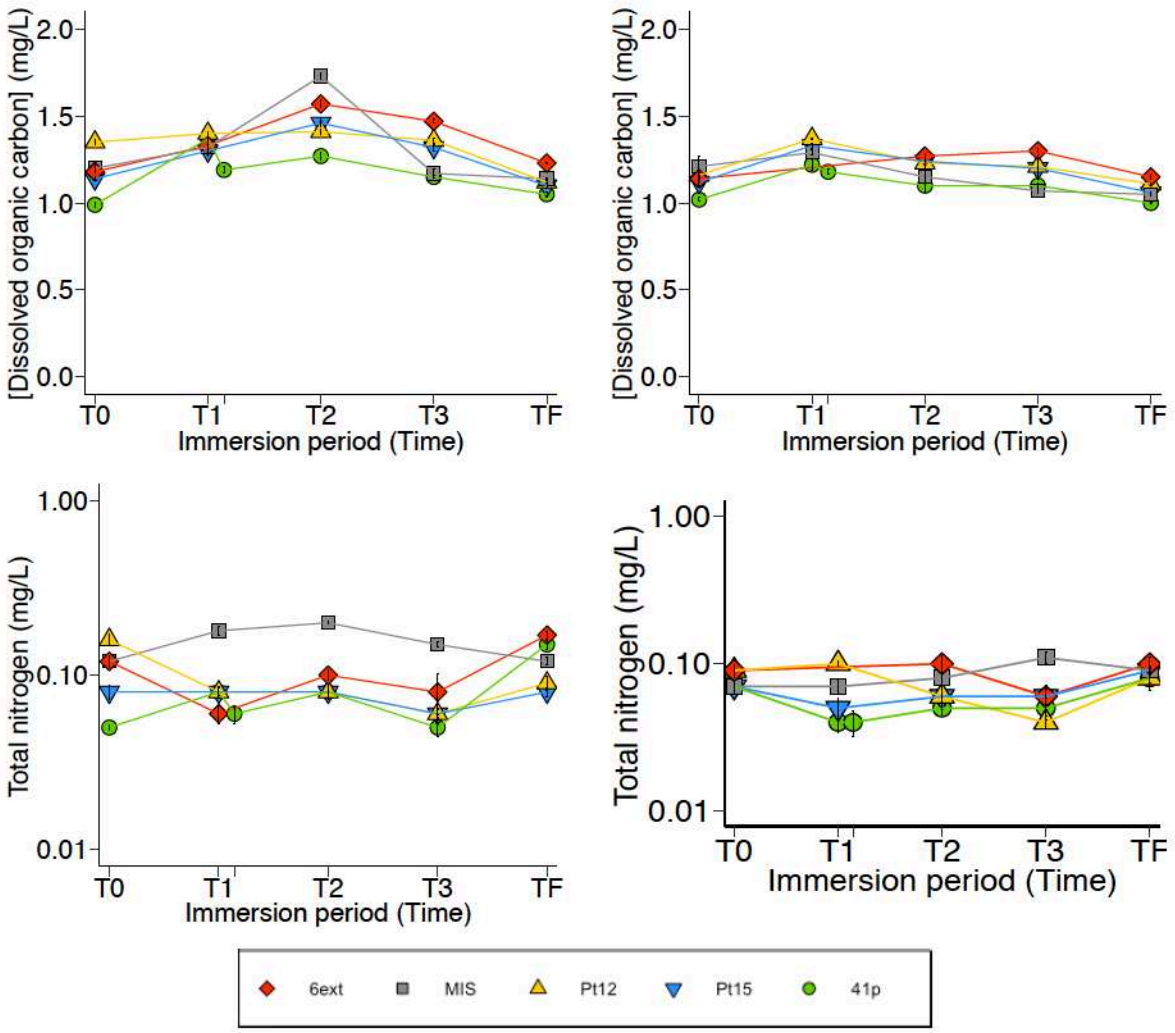


Figure C- 4 Temporal dynamics of environmental variables of June 2015 in both surface (left panel) and bottom (right panel) seawater samples. Symbols and errors bars in both Dissolved organic carbon and Total nitrogen plots represent average and standard error (n = 3), respectively.

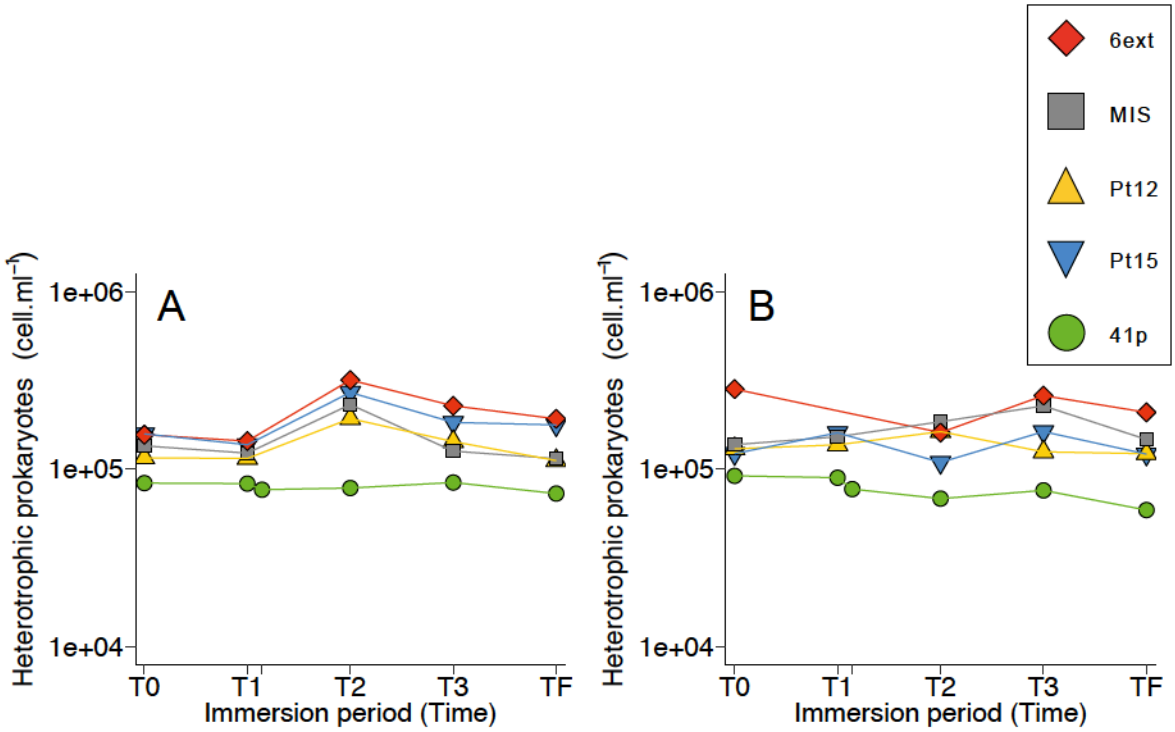


Figure C- 5 Dynamics of heterotrophic prokaryotes in surface (A) and bottom (B) seawater at the different sampling stations

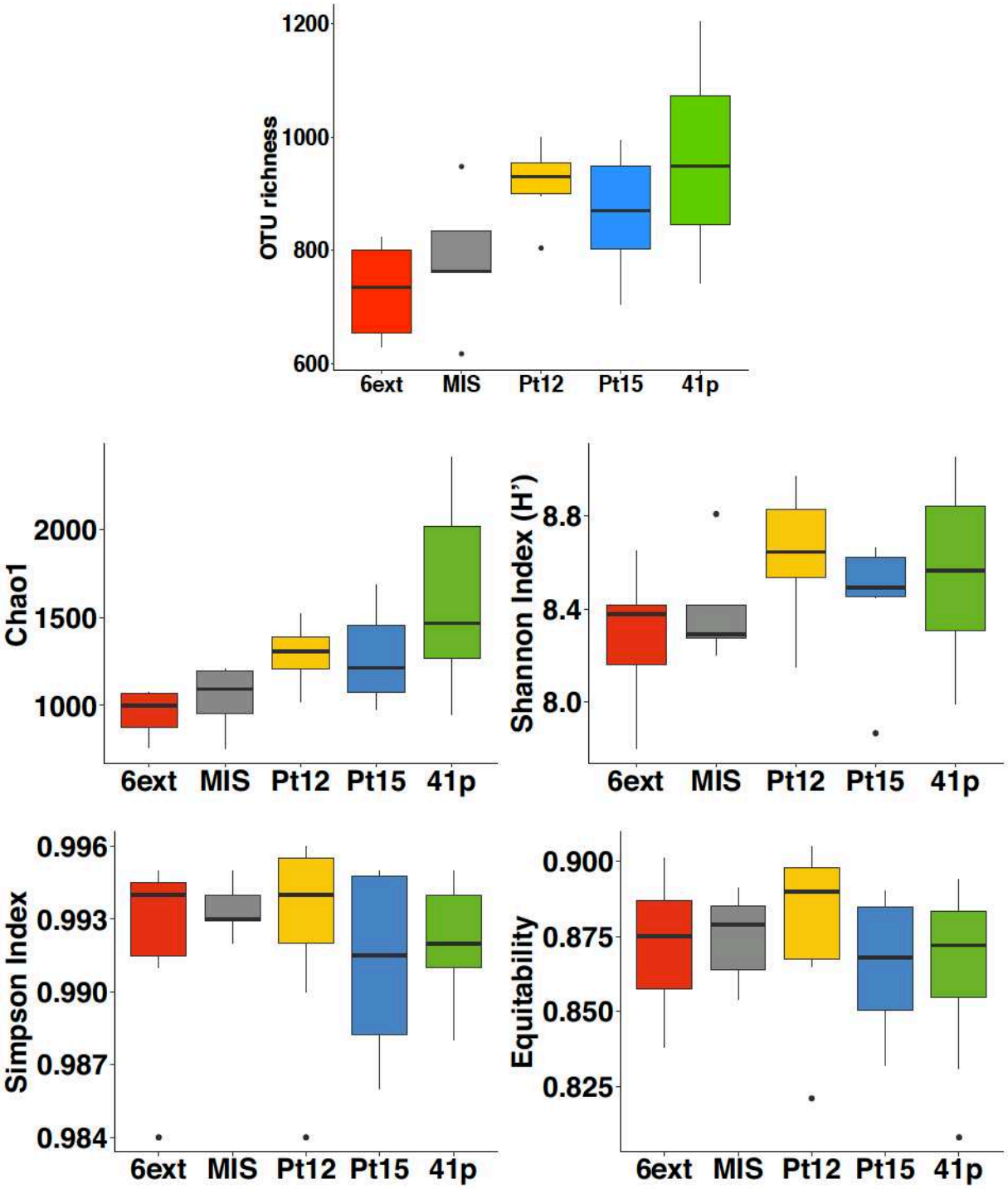


Figure C- 6 Box-plot of the Observed OTUs, Chao1, Shannon Simpson and Equitability indices for each sampling sites (*i.e.* 6ext, MIS, Pt12, Pt15 and 41p) calculated from the 36 remaining samples. Upper and lower lines correspond to the first and third quartile of the distribution of values. The median values are shown with horizontal black wide lines. Outliers are displayed as dots.

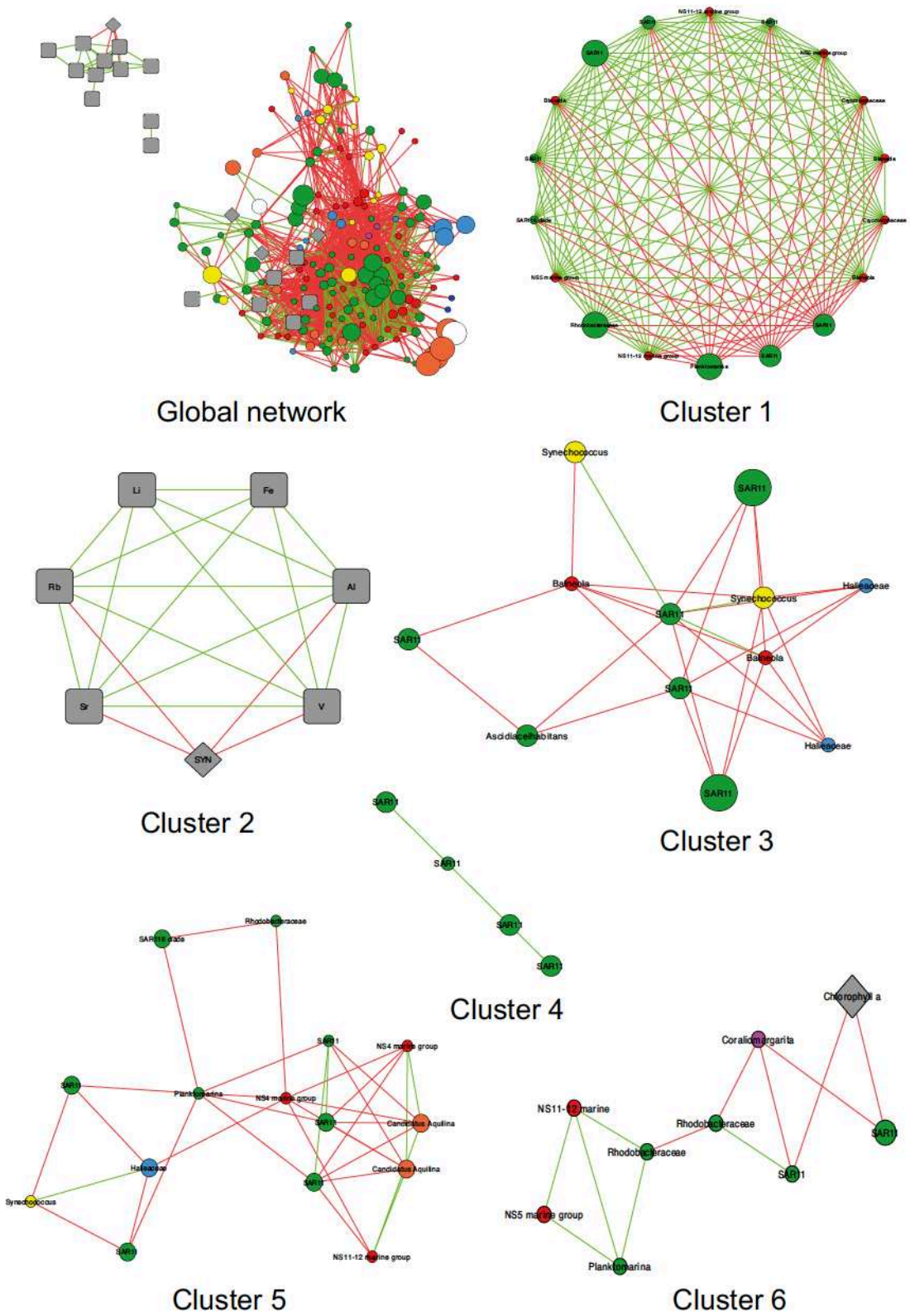


Figure C- 7 Co-occurrence global network and sub-networks according to MCODE analysis of bacterial taxa and environmental variables derived from the OTU table and showing only statistically significant correlations. Node size correspond to the relative abundance of the OTU. Nodes colors correspond to main bacterioplankton classes. Green and red lines represent positive and negative correlations, respectively.

C.3. Supplementary tables

Table C- 1 Samples characteristics in Toulon Bay.

Sample Name	Site	Depth	Time	Date	Latitude (°N)	Longitude (°E)	No. of raw amplicons	No. of amplicons after filtering	No. of OTUs	Statistical analyses
41pprof1	41p	Surface	T0	1-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	67550	19242	1045	X
41pprof3	41p	Bottom	T0	1-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	16150	5203	764	X
41pprof5	41p	Surface	T1	8-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	8214	2139	-	
41pprof7	41p	Bottom	T1	8-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	56522	13726	948	X
41pprof9	41p	Surface	T1b	9-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	27834	8457	810	X
41pprof11	41p	Bottom	T1b	9-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	34946	8903	882	X
41pprof13	41p	Surface	T2	15-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	98556	35735	742	X
41pprof15	41p	Bottom	T2	15-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	48628	14238	1110	X
41pprof17	41p	Surface	T3	22-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	35514	10663	1205	X
41pprof19	41p	Bottom	T3	22-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	40064	12419	1100	X
41pprof21	41p	Surface	TF	28-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	30794	7890	909	X
41pprof23	41p	Bottom	TF	28-Jun-2015	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	41586	12528	965	X
15prof1	Pt15	Surface	T0	1-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	15760	4349	848	X
15prof3	Pt15	Bottom	T0	1-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	12240	2908	-	
15prof5	Pt15	Surface	T1	8-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	24982	5941	788	X
15prof7	Pt15	Bottom	T1	8-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	45838	8534	993	X
15prof9	Pt15	Surface	T2	15-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	47776	13051	705	X
15prof11	Pt15	Bottom	T2	15-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	45218	9660	891	X
15prof13	Pt15	Surface	T3	22-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	32980	6527	968	X
15prof15	Pt15	Bottom	T3	22-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	7124	1557	-	
15prof17	Pt15	Surface	TF	28-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	8202	1928	-	
15prof19	Pt15	Bottom	TF	28-Jun-2015	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	9788	2584	-	
12prof1	Pt12	Surface	T0	1-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	21820	4633	804	X
12prof3	Pt12	Bottom	T0	1-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	30610	6160	999	X
12prof5	Pt12	Surface	T1	8-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	38604	7060	903	X
12prof7	Pt12	Bottom	T1	8-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	8746	1266	-	
12prof9	Pt12	Surface	T2	15-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	16898	2813	-	
12prof11	Pt12	Bottom	T2	15-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	23846	4125	896	X
12prof13	Pt12	Surface	T3	22-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	17414	2368	-	
12prof15	Pt12	Bottom	T3	22-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	33336	7427	936	X
12prof17	Pt12	Surface	TF	28-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	55852	7208	971	X
12prof19	Pt12	Bottom	TF	28-Jun-2015	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	28124	7004	930	X
MISprof1	MIS	Surface	T0	1-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	19036	4044	762	X
MISprof3	MIS	Bottom	T0	1-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	13550	2828	-	
MISprof5	MIS	Surface	T1	8-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	25806	5595	763	X

MISprof7	MIS	Bottom	T1	8-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	27530	4296	835	X
MISprof9	MIS	Surface	T2	15-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	16944	3730	-	
MISprof11	MIS	Bottom	T2	15-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	14946	2977	-	
MISprof13	MIS	Surface	T3	22-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	20490	4057	948	X
MISprof15	MIS	Bottom	T3	22-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	21712	4650	617	X
MISprof17	MIS	Surface	TF	28-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	17270	3913	-	
MISprof19	MIS	Bottom	TF	28-Jun-2015	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	21438	3350	-	
6extprof1	6ext	Surface	T0	1-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	22718	4846	800	X
6extprof3	6ext	Bottom	T0	1-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	32860	7517	635	X
6extprof5	6ext	Surface	T1	8-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	30190	5032	630	X
6extprof7	6ext	Bottom	T1	8-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	14116	4170	734	X
6extprof9	6ext	Surface	T2	15-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	16930	4044	801	X
6extprof11	6ext	Bottom	T2	15-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	44004	3948	-	
6extprof13	6ext	Surface	T3	22-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	20680	4549	823	X
6extprof15	6ext	Bottom	T3	22-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	9016	2552	-	
6extprof17	6ext	Surface	TF	28-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	54180	11316	672	X
6extprof19	6ext	Bottom	TF	28-Jun-2015	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	13856	3349	-	

Table C- 2 Environmental (biotic and abiotic) characteristics of seawater samples in June 2015. The values represent the mean between surface and bottom samples and the standard deviation for each parameter.

Site	Date	Al	As	Ba	Be	Cs	Cr	Fe	Li	Mn
		(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)	(nM)
41p	T0	9358 ± 405	28 ± 0,5	59 ± 0,20	23 ± 5,2	2,6 ± 0,0	14 ± 1,9	116 ± 9,5	33167 ± 1818	17 ± 0,60
	T1	8918 ± 100	23 ± 2,5	61 ± 1,7	24 ± 7,2	2,7 ± 0,05	7,8 ± 0,45	98 ± 9,7	30461 ± 382	17 ± 2,2
	T1b	8330 ± 236	25 ± 2,3	63 ± 0,35	39 ± 6,5	2,6 ± 0,0	6,4 ± 0,90	88 ± 1,4	28587 ± 594	15 ± 0,60
	T2	52 ± 18	23 ± 0,35	59 ± 1,6	44 ± 9,8	2,5 ± 0,10	3,9 ± 1,9	15 ± 0,09	27782 ± 379	11 ± 2,2
	T3	193 ± 26	30 ± 3,6	57 ± 0,85	53 ± 1,3	2,5 ± 0,05	4,6 ± 0,55	13 ± 3,1	26165 ± 29	10 ± 1,2
	TF	2068 ± 87	28 ± 2,3	57 ± 0,45	89 ± 0,65	2,4 ± 0,0	6,3 ± 0,8	55 ± 21	27020 ± 147	14 ± 0,09
Pt15	T0	11044 ± 89	27 ± 2,7	60 ± 0,05	41 ± 2,0	2,6 ± 0,0	11 ± 1,2	155 ± 9,4	37593 ± 537	31 ± 2,7
	T1	8594 ± 196	30 ± 0,25	64 ± 0,95	36 ± 5,2	2,6 ± 0,0	7,9 ± 0,55	103 ± 14	28962 ± 147	28 ± 2,6
	T2	137 ± 46	24 ± 0,25	59 ± 2,05	36 ± 10	2,4 ± 0,0	5,3 ± 0,0	45 ± 15	27022 ± 56	27 ± 6,3
	T3	252 ± 29	29 ± 4.0	59 ± 0,05	44 ± 3,9	2,5 ± 0,0	5,7 ± 0,75	33 ± 6,6	26242 ± 104	17 ± 1,4
	TF	2228 ± 51	26 ± 2,0	60 ± 0,05	72 ± 19	2,6 ± 0,0	5,2 ± 0,80	158 ± 110	27834 ± 112	17 ± 1,3
Pt12	T0	11007 ± 97	25 ± 3,3	59 ± 0,75	42 ± 5,2	2,6 ± 0,05	11 ± 0,20	133 ± 2,7	36473 ± 15	25 ± 1,9
	T1	9070 ± 652	27 ± 2,4	70 ± 5,4	33 ± 0,0	2,6 ± 0,0	5,8 ± 0,25	108 ± 6,0	29454 ± 279	41 ± 11
	T2	163 ± 31	24 ± 1,9	59 ± 1,2	42 ± 0,0	2,4 ± 0,0	5,6 ± 0,25	21 ± 7,5	26666 ± 239	29 ± 3,2
	T3	344 ± 12	24 ± 7,05	59 ± 0,0	64 ± 5,2	2,6 ± 0,05	5,2 ± 0,6	20 ± 1,7	27049 ± 347	18 ± 0,65
	TF	2050± 500	21 ± 3,0	58 ± 0,95	65 ± 13	2,5 ± 0,0	9,6 ± 3,0	41 ± 7,9	25734 ± 1912	18 ± 1,05
MIS	T0	9663 ± 195	26 ± 1,7	63 ± 0,90	34 ± 1,3	2,6 ± 0,05	10 ± 0,45	110 ± 2,0	33726 ± 409	25 ± 1,2
	T1	8654 ± 161	20 ± 1,9	65 ± 2,7	46 ± 0,0	2,6 ± 0,0	6,8 ± 1,7	104 ± 2,2	28456 ± 505	30 ± 0,40
	T2	136 ± 50	24 ± 0,80	62 ± 3,3	50 ± 3,3	2,4 ± 0,10	5,05 ± 0,45	28 ± 9,3	26153 ± 393	33 ± 3,0
	T3	356 ± 41	28 ± 3,3	59 ± 1,3	64 ± 0,65	2,5 ± 0,05	5,5 ± 0,35	29 ± 3,0	27067 ± 419	20 ± 0,50
	TF	1940 ± 87	28 ± 1,2	59 ± 0,20	83 ± 22	2,5 ± 0,05	8,2 ± 1,3	50 ± 0,75	24853 ± 610	17 ± 0,0
6ext	T0	10154 ± 571	26 ± 1,2	70 ± 1,6	31 ± 2,0	2,6 ± 0,0	6,4 ± 0,2	120 ± 17	31818 ± 217	44 ± 13
	T1	8392 ± 0,0	27 ± 0,0	74 ± 0,0	47 ± 0,0	2,7 ± 0,0	6,6 ± 0,0	111 ± 0,0	29390 ± 0,0	34 ± 0,0
	T2	193 ± 32	30 ± 2,0	65 ± 2,7	46 ± 3,3	2,5 ± 0,05	4,8 ± 0,15	33 ± 6,9	25905 ± 669	41 ± 5,1
	T3	327 ± 9,6	27 ± 7,1	63 ± 1,7	79 ± 8,5	2,5 ± 0,0	4,5 ± 0,10	42 ± 0,5	27231 ± 640	32 ± 9,5
	TF	2614 ± 51	33 ± 0,85	73 ± 6,1	107 ± 1,3	2,6 ± 0,05	6,2 ± 1,8	63 ± 7,0	26565 ± 77	37 ± 11

Table C- 2 Continued

Site	Date	Mo95 (nM)	Rb (nM)	Sb (nM)	Sn (nM)	Sr (nM)	Ti (nM)	U (nM)	V (nM)
41p	T0	152 ± 2,0	1529 ± 27	3,6 ± 0,05	2,0 ± 0,45	109807 ± 1597	25 ± 1,5	13 ± 0,75	47 ± 1,9
	T1	159 ± 3,0	1502 ± 8,2	3,4 ± 0,20	2,0 ± 0,05	108072 ± 3623	23 ± 1,0	16 ± 0,35	46 ± 1,7
	T1b	171 ± 0,55	1464 ± 10	3,3 ± 0,20	2,2 ± 0,10	106015 ± 702	22 ± 1,4	17 ± 0,0	45 ± 0,101
	T2	164 ± 11	1461 ± 14	3,6 ± 0,05	1,8 ± 0,15	104642 ± 1296	0,80 ± 0,0	16 ± 1,3	41 ± 0,30
	T3	1601 ± 0,65	1450 ± 1,0	3,7 ± 0,09	1,4 ± 0,0	103385 ± 474	3,2 ± 1,1	16 ± 0,0	39 ± 1,5
	TF	168 ± 0,05	1453 ± 6,0	3,9 ± 0,10	1,2 ± 0,0	103734 ± 75	6,2 ± 0,40	16 ± 0,0	43 ± 1,8
Pt15	T0	159 ± 1,7	1593 ± 9,8	3,8 ± 0,20	2,35 ± 0,05	113367 ± 718	29 ± 2,9	12 ± 0,15	50 ± 0,0
	T1	164 ± 1,0	1467 ± 4,9	3,5 ± 0,0	2,1 ± 0,0	104931 ± 701	23 ± 1,8	17 ± 0,10	45 ± 1,4
	T2	151 ± 0,55	1429 ± 11	3,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	102450 ± 969	2,1 ± 0,0	15 ± 0,10	40 ± 0,0
	T3	162 ± 0,50	1439 ± 3,9	3,9 ± 0,10	1,35 ± 0,05	104415 ± 351	2,3 ± 1,7	16 ± 0,05	40 ± 2,2
	TF	172 ± 1,6	1457 ± 9,3	5,5 ± 0,05	1,2 ± 0,0	104481 ± 612	8,3 ± 1,3	16 ± 0,10	44 ± 0,20
Pt12	T0	156 ± 0,35	1556 ± 0,40	3,7 ± 0,05	2,2 ± 0,0	111328 ± 778	32 ± 0,50	12 ± 0,35	49 ± 0,40
	T1	163 ± 1,2	1479 ± 2,3	4,8 ± 1,2	3,6 ± 1,3	106465 ± 396	25 ± 0,60	17 ± 0,0	44 ± 2,2
	T2	153 ± 2,4	1420 ± 16	3,8 ± 0,10	1,65 ± 0,05	101902 ± 383	0,60 ± 0,0	15 ± 0,15	39 ± 0,40
	T3	164 ± 2,2	1441 ± 2,5	4,0 ± 0,15	1,3 ± 0,0	103906 ± 8,6	3,1 ± 1,2	16 ± 0,0	40 ± 1,7
	TF	165 ± 5,8	1428 ± 41	5,7 ± 0,35	1 ± 0,0	102253 ± 1402	5,4 ± 1,3	16 ± 0,35	39 ± 1,7
MIS	T0	154 ± 1,0	1524 ± 2,0	3,5 ± 0,10	1,95 ± 0,05	109185 ± 607	33 ± 1,6	14 ± 0,25	47 ± 0,40
	T1	167 ± 3,2	1459 ± 15	3,8 ± 0,10	2,3 ± 0,10	105079 ± 863	27 ± 1,5	17 ± 0,15	44 ± 1,0
	T2	155 ± 2,3	1424 ± 21	4,1 ± 0,35	1,6 ± 0,0	102697 ± 1857	0,80 ± 0,0	15 ± 0,25	38 ± 0,20
	T3	165 ± 0,25	1432 ± 11	4,2 ± 0,05	1,5 ± 0,0	102172 ± 1461,05	1,8 ± 0,95	16 ± 0,10	40 ± 0,80
	TF	163 ± 1,0	1405 ± 13	5,7 ± 0,10	1,05 ± 0,05	101164 ± 810	9,4 ± 1,6	16 ± 0,15	39 ± 0,70
6ext	T0	157 ± 0,40	1505 ± 2,2	4,9 ± 0,20	2,35 ± 0,05	107618 ± 321	30 ± 3,6	15 ± 0,25	46 ± 1,6
	T1	173 ± 0,0	1489 ± 0,0	4,8 ± 0,0	2,4 ± 0,0	107221 ± 0,0	27 ± 0,0	17 ± 0,0	44 ± 0,0
	T2	155 ± 2,7	1418 ± 37	4,7 ± 0,30	1,7 ± 0,0	102095 ± 2733	1,4 ± 0,35	15 ± 0,40	38 ± 1,7
	T3	167 ± 2,8	1450 ± 19	5,7 ± 0,20	1,55 ± 0,15	103881 ± 490	4,5 ± 1,2	16 ± 0,30	40 ± 1,7
	TF	168 ± 0,75	1440 ± 12	7,6 ± 1,0	1,55 ± 0,25	103208 ± 28	9,8 ± 3,4	16 ± 0,20	44 ± 1,0

Table C- 2 Continued

Site	Date	Dissolved oxygen	Dissolved oxygen	pH	Picoeukaryote	Nanoeukaryote
		(mg.L^{-1})	(%)	-	Cell.mL^{-1}	Cell.mL^{-1}
41p	T0	114 ± 0.15	8.6 ± 0.12	8.7 ± 0.01	2652 ± 244	1616 ± 26
	T1	117 ± 1.5	8.6 ± 0.22	8.6 ± 0.02	52 ± 28	76 ± 26
	T1b	119 ± 1.6	8.7 ± 0.40	8.6 ± 0.01	728 ± 500	1398 ± 556
	T2	110 ± 1.8	7.8 ± 0.21	8.7 ± 0.02	1236 ± 736	1357 ± 307
	T3	112 ± 2.8	8.0 ± 0.39	7.9 ± 0.10	492 ± 132	1049 ± 107
	TF	109 ± 0.70	7.8 ± 0.12	7.9 ± 0.02	286 ± 76	441 ± 29
Pt15	T0	117 ± 3.6	8.3 ± 0.22	8.7 ± 0.01	6737 ± 1995	4635 ± 1409
	T1	116 ± 2.6	8.3 ± 0.0	8.7 ± 0.04	327 ± 97	313 ± 39
	T2	112 ± 1.2	7.8 ± 0.03	8.7 ± 0.01	14068 ± 8138	4763 ± 1653
	T3	114 ± 1.7	8.0 ± 0.10	8.0 ± 0.02	2069 ± 261	2475 ± 185
	TF	113 ± 1.3	7.9 ± 0.02	7.9 ± 0.01	3420 ± NA	2352 ± NA
Pt12	T0	117 ± 0.65	NA	8.7 ± 0.01	3750 ± 372	3049 ± 139
	T1	117 ± 1.1	8.3 ± 0.19	8.7 ± 0.01	505 ± 47	644 ± 320
	T2	113 ± 2.6	7.8 ± 0.11	8.7 ± 0.02	12033 ± 3589	6821 ± 2283
	T3	114 ± 0.19	8.0 ± 0.08	8.0 ± 0.02	2675 ± 577	2889 ± 39
	TF	116 ± 0.15	8.1 ± 0.09	8.0 ± 0.03	2967 ± 1123	2678 ± 460
MIS	T0	123 ± 1.7	NA	8.6 ± 0.03	5165 ± 729	4246 ± 290
	T1	122 ± 1.2	8.6 ± 0.14	8.7 ± 0.04	6690 ± 3656	5429 ± 963
	T2	109 ± 12	7.6 ± 0.73	8.7 ± 0.04	14735 ± 6003	8700 ± 3826
	T3	111 ± 5.4	7.8 ± 0.22	7.9 ± 0.03	8153 ± 1749	4078 ± 796
	TF	117 ± 1.6	8.2 ± 0.07	7.9 ± 0.02	11351 ± 3131	5537 ± 471
6ext	T0	113 ± 8.4	8.3 ± 0.40	8.6 ± 0.04	15247 ± 4973	6236 ± 624
	T1	NA	NA	NA	926 ± NA	2230 ± NA
	T2	106 ± 15	7.3 ± 0.93	8.7 ± 0.01	12863 ± 6431	7486 ± 4612
	T3	108 ± 5.9	7.6 ± 0.30	7.9 ± 0.03	8403 ± 1285	3444 ± 330
	TF	113 ± 8.2	7.8 ± 0.39	7.9 ± 0.10	16378 ± 3204	5666 ± 1492

Table C- 3 Global and pairwise Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) examining the effects of the factors "Site", "Date" and "Depth" on the bacterioplankton communities. Key to abbreviations and column headings: D.f, degrees of freedom; MS, mean square; F, F ratio; R^2, coefficient of determination; P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Source of variation	D.f	MS	F	R^2	P	Significance
Site	**4**	**0.146172**	**7.1909**	**0.46071**	**0.001**	***
Date	**5**	**0.043509**	**2.1404**	**0.17142**	**0.024**	*
Depth	1	0.002537	0.1248	0.00200	0.983	
Site:Date	13	0.016955	0.8341	0.17367	0.696	
Residuals	12	0.020327	0.19221			
Total	35	1.00000				

	41p	6ext	MIS	Pt12
6ext	**0.0050** ***	-	-	-
MIS	**0.0050** ***	0.9270	-	-
Pt12	**0.0067** ***	**0.0280** *	0.1714	-
Pt15	**0.0125** *	**0.0483** *	0.1725	0.3522

Table C- 4 The contribution of particular biomarker to the Bray-Curtis similarity index in 41p-Pt15, 41p-MIS, 41p-6ext, Pt15-MIS, Pt15-6ext and MIS-6ext, using SIMPER (similarity of percentage) analysis. The cut-off for low contribution was set at a cumulative contribution of 90%. P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

41p - Pt15				
Biomarker		Contribution	Cumulative	P
Higher taxonomic rank	Phylum / Class	%	%	-
PS1 clade	Alphaproteobacteria	1.81	32.42	0.004 **
PS1 clade uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.72	35.32	0.007 **
OM43 clade	Betaproteobacteria	1.69	38.17	0.001 ***
Methylophilaceae	Betaproteobacteria	1.67	40.99	0.002 **
Methylophilales	Betaproteobacteria	1.67	43.80	0.002 **
Betaproteobacteria	Proteobacteria	1.50	48.99	0.001 ***
NS7 marine group Other	Flavobacteriia	1.49	51.49	0.004 **
NS7 marine group	Flavobacteriia	1.49	54.00	0.004 **
SAR406 clade uncultured bacterium	Marinimicrobia	1.43	56.41	0.003 **
SAR406 clade	Marinimicrobia	1.43	58.83	0.003 **
S25_593 uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.27	60.98	0.003 **
S25_593	Alphaproteobacteria	1.27	63.12	0.003 **
Rhizobiales	Alphaproteobacteria	1.19	67.24	0.006 **
Surface 4	Alphaproteobacteria	1.15	69.17	0.025 *
Flammeovirgaceae uncultured	Cytophagia	1.13	71.08	0.008 **
Rickettsiales	Alphaproteobacteria	1.06	78.35	0.001 ***
SAR116 clade	Alphaproteobacteria	1.05	80.12	0.002 **

41p - MIS				
Biomarker		Contribution	Cumulative	P
Higher taxonomic rank	Phylum / Class	%	%	-
Candidatus Aquiluna	Actinobacteria	6.68	9.61	0.002 **
Microbacteriaceae	Actinobacteria	5.55	17.58	0.002 **
Micrococcales	Actinobacteria	5.53	25.54	0.002 **
Actinobacteria	Actinobacteria	5.08	32.85	0.003 **
PS1 clade	Alphaproteobacteria	2.11	42.58	0.003 **
PS1 clade uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.91	45.33	0.017 *
NS7 marine group Other	Flavobacteriia	1.79	47.89	0.001 ***
NS7 marine group	Flavobacteriia	1.79	50.46	0.001 ***
Surface 4	Alphaproteobacteria	1.47	54.70	0.003 **
SAR406 clade uncultured bacterium	Marinimicrobia	1.47	56.81	0.009 **
SAR406 clade	Marinimicrobia	1.47	58.92	0.009 **
Candidatus Actinomarina	Acidimicrobiia	1.46	61.02	0.012 *
OM1 clade	Acidimicrobiia	1.44	63.09	0.012 *

S25_593 uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.38	65.07	0.006 **
S25_593	Alphaproteobacteria	1.38	67.04	0.006 **
Acidimicrobiales	Acidimicrobiia	1.37	69.01	0.012 *
Acidimicrobiia	Actinobacteria	1.37	70.97	0.012 *
Rhizobiales	Alphaproteobacteria	1.36	72.92	0.002 **
SAR116 clade	Alphaproteobacteria	1.30	74.80	0.001 ***
Rickettsiales	Alphaproteobacteria	1.29	76.65	0.001 ***
Thiothrix	Gammaproteobacteria	1.26	78.46	0.024 *
Thiotrichaceae	Gammaproteobacteria	1.26	80.26	0.024 *
Thiotrichales	Gammaproteobacteria	1.26	82.07	0.024 *
Flammeovirgaceae uncultured	Cytophagia	1.16	83.74	0.035 *
SAR116 clade uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.00	89.86	0.001 ***

41p - 6ext

Biomarker		Contribution	Cumulative	P
Higher taxonomic rank	Phylum / Class	%	%	-
Candidatus Aquiluna	Actinobacteria	5.75	7.74	0.008 **
Microbacteriaceae	Actinobacteria	4.79	14.19	0.010 **
Micrococcales	Actinobacteria	4.78	20.63	0.010 **
Planktomarina	Alphaproteobacteria	4.66	26.90	0.001 ***
Actinobacteria	Actinobacteria	4.35	32.75	0.017 *
Tenacibaculum	Flavobacteriia	3.25	37.14	0.001 ***
PS1 clade	Alphaproteobacteria	2.01	39.85	0.002 **
NS7 marine group Other	Flavobacteriia	1.90	42.40	0.001 ***
NS7 marine group	Flavobacteriia	1.90	44.96	0.001 ***
PS1 clade uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.83	47.42	0.007 **
Formosa	Flavobacteriia	1.67	49.67	0.001 ***
Candidatus Actinomarina	Acidimicrobiia	1.65	51.89	0.001 ***
OM1 clade	Acidimicrobiia	1.63	54.08	0.001 ***
Surface 4 uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.58	56.21	0.003 **
Acidimicrobiales	Acidimicrobiia	1.53	58.27	0.001 ***
Acidimicrobiia	Actinobacteria	1.53	60.33	0.001 ***
Surface 4	Alphaproteobacteria	1.52	62.37	0.001 ***
S25_593 uncultured bacterium	Alphaproteobacteria	1.44	64.31	0.001 ***
S25_593	Alphaproteobacteria	1.44	66.24	0.001 ***
OM43 clade	Betaproteobacteria	1.40	68.13	0.037 *
Methylophilaceae	Betaproteobacteria	1.38	70.00	0.049 *
Methylophilales	Betaproteobacteria	1.38	71.86	0.049 *
SAR406 clade uncultured bacterium	Marinimicrobia	1.38	73.72	0.004 **
SAR406 clade	Marinimicrobia	1.38	75.58	0.004 **
SAR116 clade	Alphaproteobacteria	1.37	77.42	0.001 ***
Rickettsiales	Alphaproteobacteria	1.35	79.25	0.001 ***
Hydrogenophilaceae uncultured	Betaproteobacteria	1.32	81.03	0.001 ***

Rhizobiales	Alphaproteobacteria	1.32	82.80	0.002 **
Hydrogenophilaceae	Betaproteobacteria	1.30	84.55	0.001 ***
Hydrogenophilales	Betaproteobacteria	1.30	86.29	0.001 ***
Thiothrix	Gammaproteobacteria	1.24	87.96	0.010 **
Thiotrichaceae	Gammaproteobacteria	1.24	89.63	0.010 **

Pt15 - MIS

Biomarker		Contribution	Cumulative	P
Higher taxonomic rank	Phylum / Class	%	%	-
NS3a marine group	Flavobacteriia	2.30	56.78	0.001 ***

Pt15 - 6ext

Biomarker		Contribution	Cumulative	P
Higher taxonomic rank	Phylum / Class	%	%	-
NS3a marine group	Flavobacteriia	1.96	58.69	0.004 **
Formosa	Flavobacteriia	1.19	61.53	0.049 *

MIS - 6ext

Biomarker		Contribution	Cumulative	P
Higher taxonomic rank	Phylum / Class	%	%	-
Formosa	Flavobacteriia	1.26	59.85	0.046 *

Table C- 5 Results for variation partitioning with the environmental variables, which were selected by forward selection in the redundancy analyses (RDAs) (see Figure 4 in the main manuscript). The contribution (%) of each environmental variable and its significance are given.

Variable	Df	Variance	F	P
Residual	15	14,3275	-	-
Mn	1	1,2155	1,2726	**0.033 ***
DOC	1	1,2114	1,2682	**0.038 ***
Salinity	1	1,1169	1,1693	**0.032 ***
Cu	1	1,1144	1,1667	**0.047 ***
Cd	1	1,013	1,0606	**0.049 ***
Temperature	1	0,9304	0,9741	0.073
Cs	1	0,822	0,8605	0.087
Al	1	0,7796	0,8162	0.115
Fe	1	0,7228	0,7567	0.174
Li	1	0,6641	0,6953	0.135
Nanoeukaryotes	1	0,6113	0,64	0.243
Rb	1	0,6042	0,6326	0.234
V	1	0,563	0,5894	0.243
Chlorophyll *a*	1	0,554	0,58	0.325
Pb	1	0,5078	0,5316	0.338
Zn	1	0,4847	0,5075	0.369
TN	1	0,4753	0,4976	0.374
Ba	1	0,4714	0,4935	0.344
Sr	1	0,4324	0,4527	0.425
Picoeukaryotes	1	0,3852	0,4032	0.451

Table C- 6 Network analysis results, showing betweenness centrality (BC), closeness centrality (CC), number of connections (Degree) and relative abundance of keystone OTUs in the global network.

Kingdom	Class	Family	Genus	Label	BC	CC	Degree	Abundance
Bacteria	Alphaproteobacteria	Surface 1	uncultured bacterium	OTU-New.ReferenceOTU431	0.076	0.61	74	0.14
Bacteria	Alphaproteobacteria	Surface 1	uncultured bacterium	uncultured bacteriumcross233	0.046	0.57	64	0.14
Bacteria	Alphaproteobacteria	Surface 1	uncultured bacterium	OTU-New.ReferenceOTU241	0.068	0.55	68	0.20
Bacteria	Alphaproteobacteria	Surface 1	uncultured bacterium	uncultured bacteriumcross146	0.066	0.545	68	0.20
Bacteria	Actinobacteria	Microbacteriaceae	Candidatus Aquiluna	OTU-New.ReferenceOTU237	0.054	0.55	55	0.18
Bacteria	Cyanobacteria	FamilyI	Synechococcus	OTU-New.ReferenceOTU365	0.021	0.55	55	0.27
Bacteria	Bacteroidetes Incertae Sedis	Unknown Family	Balneola	uncultured bacteriumcross200	0.020	0.55	56	0.05
Bacteria	Actinobacteria1	Microbacteriaceae	Candidatus Aquiluna	uncultured bacteriumcross174	0.027	0.54	52	0.18
Bacteria	Cyanobacteria	FamilyI	Synechococcus	OTU-New.ReferenceOTU245	0.021	0.52	38	0.09
Bacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Planktomarina	OTU-New.ReferenceOTU394	0.024	0.51	46	0.0
Bacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	uncultured	uncultured bacteriumcross104	0.048	0.51	35	0.21
Bacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	Planktomarina	Planktomarina	0.027	0.51	46	0.30

Table C- 7 Fraction of OTUs not mapped to KEGG organisms (FTU) and percentage of OTUs mapped to KEGG organisms (%).

Sample	FTU	%
41pprof1	0,59	41,01
41pprof3	0,54	46,10
41pprof7	0,51	48,73
41pprof9	0,56	44,22
41pprof11	0,60	39,72
41pprof13	0,37	63,04
41pprof15	0,56	43,79
41pprof17	0,52	47,82
41pprof19	0,61	39,11
41pprof21	0,50	49,85
41pprof23	0,48	51,98
Pt15prof1	0,31	68,59
Pt15prof5	0,36	63,58
Pt15prof7	0,49	50,89
Pt15prof9	0,30	70,47
Pt15prof11	0,39	60,84
Pt15prof13	0,52	47,54
Pt12prof1	0,33	67,25
Pt12prof3	0,44	56,18
Pt12prof5	0,35	65,27
Pt12prof11	0,40	59,73
Pt12prof15	0,45	55,45
Pt12prof17	0,40	60,39
Pt12prof19	0,40	60,31
MISprof1	0,24	76,44
MISprof5	0,23	77,20
MISprof7	0,34	66,08
MISprof13	0,40	59,63
MISprof15	0,29	71,05
6extprof1	0,25	75,23
6extprof3	0,22	78,04
6extprof5	0,31	68,74
6extprof9	0,24	76,17
6extprof11	0,39	60,76
6extprof13	0,35	64,82
6extprof17	0,27	72,54

ANNEXE D. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 4

D.1. Supplementary materials

D.1.1. Data analysis

Alpha diversity indices were calculated using QIIME script core_diversity_analyses.py (Caporaso *et al.*, 2010). Post-hoc comparison between samples were made using Tukey HSD test. PERMANOVA analyses were run with 9999 permutations, permutation of residuals under a reduced model, type III (partial) sum of squares, Monte Carlo tests, and fixed effects sum to zero. The linear discriminant analysis (LDA) effect size method (LEfSe) (Segata *et al.*, 2011) was performed with the LEfSe online tool in the Galaxy framework, using all default setting for data formatting and LDA effect size (Goecks *et al.*, 2010).

CoNeT (Cooccurrence Network) plugin 1.1.1.beta program (Faust and Raes, 2016) was chosen as it allows the merging of networks calculated via several association methods of which we chose: Kendall, Spearman, and Pearson correlations, as well as Steinhaus and variance of log-ratio similarities. This initial network was re-defined by randomization. A permutation matrix representing a null distribution was obtained by resampling OTUs as described in Faust and Raes (Faust and Raes, 2016). In a permutation step, edge specific p-values were computed ; however, for the final network, p-values of an edge were merged into one p-value according to Brown's method. In the final step, the Benjamini-Hochberg multiple testing correction was applied ($p < 0.05$). Only edges confirmed by a score either smaller than −0.8 (negative association) or larger than 0.8 (positive association) were retained in the final network. The resulting network was visualized and graphically organized using Cytoscape 3.4.0 (Shannon *et al.*, 2003).

D.2. Supplementary figures

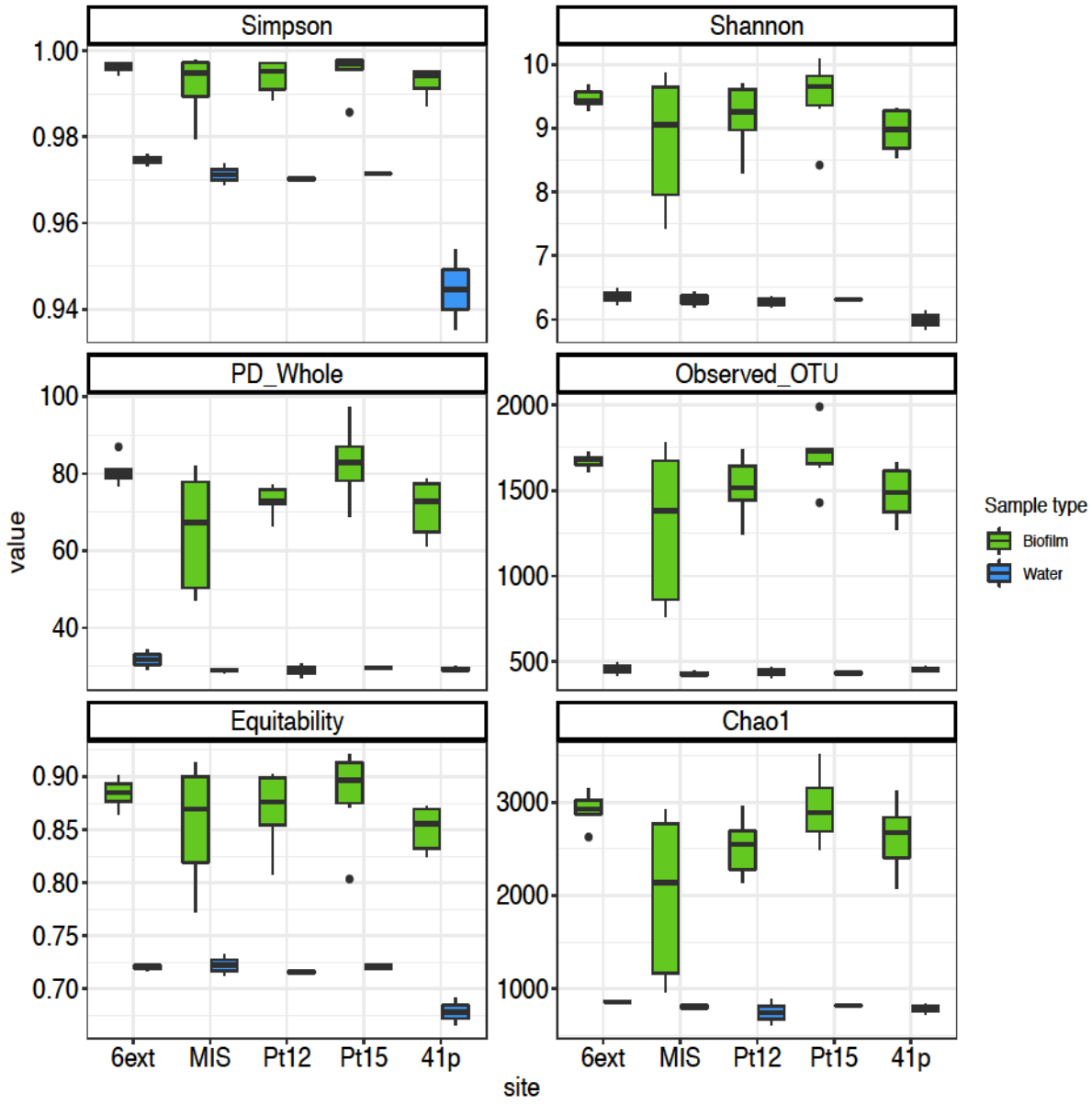


Figure D- 1 Alpha-diversity descriptors including Simpson, Shannon, PD_Whole, Observed OTU, equitability and Chao1 calculated from 16S rRNA OTU table along each sampling sites (*i.e.* 6ext, MIS, Pt12, Pt15 and 41p) in seawater (blue) and biofilm (green) samples. Upper and lower lines correspond to the first and third quartile of the distribution of values. The median values are shown with horizontal black wide lines. Outliers are displayed as dots.

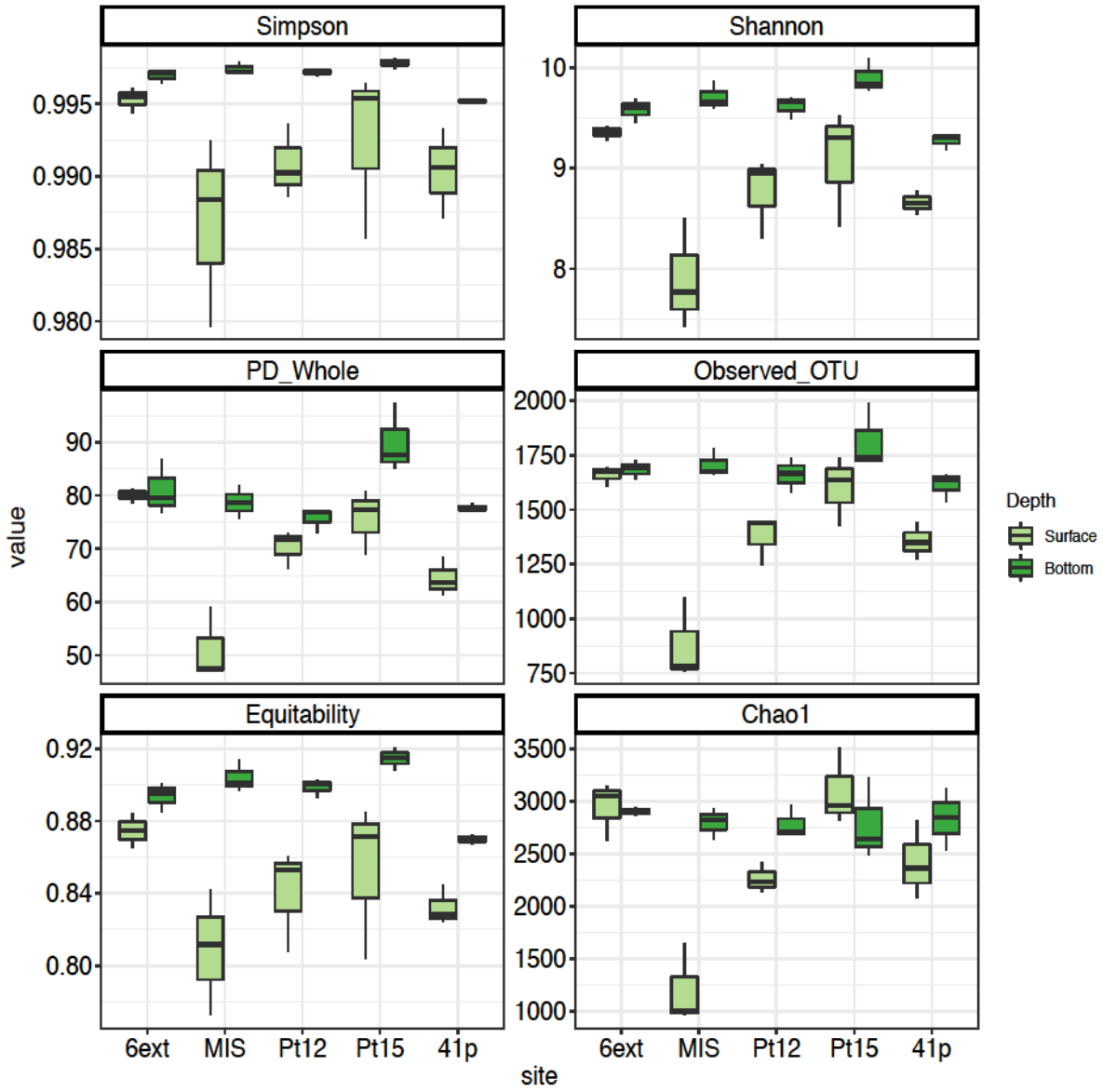


Figure D- 2 Alpha-diversity descriptors including Simpson, Shannon, PD_Whole, Observed OTU, equitability and Chao1 calculated from 16S rRNA OTU table along each sampling sites (*i.e.* 6ext, MIS, Pt12, Pt15 and 41p) in surface (light green) and bottom (dark green) samples. Upper and lower lines correspond to the first and third quartile of the distribution of values. The median values are shown with horizontal black wide lines. Outliers are displayed as dots.

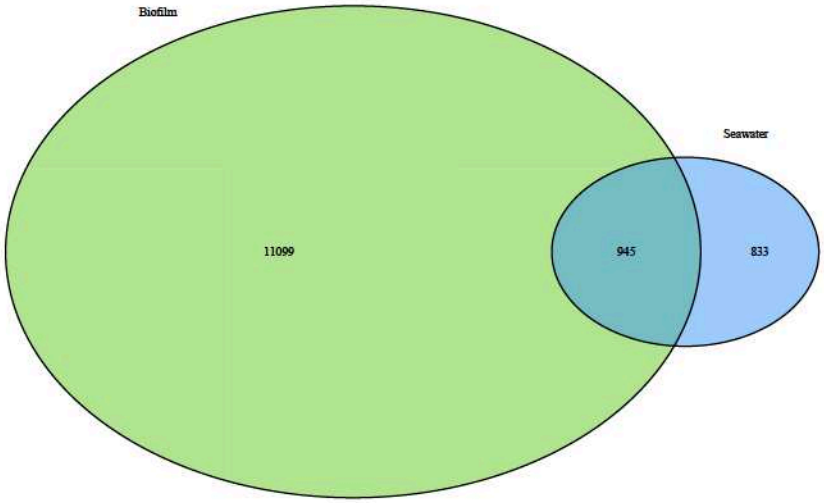


Figure D- 3 Venn diagram showing microbial OTUs overlap for pooled biofilm samples, and seawater samples at Toulon Bay. Numbers inside the circles represent the number of shared or unique OTUs for the given environment.

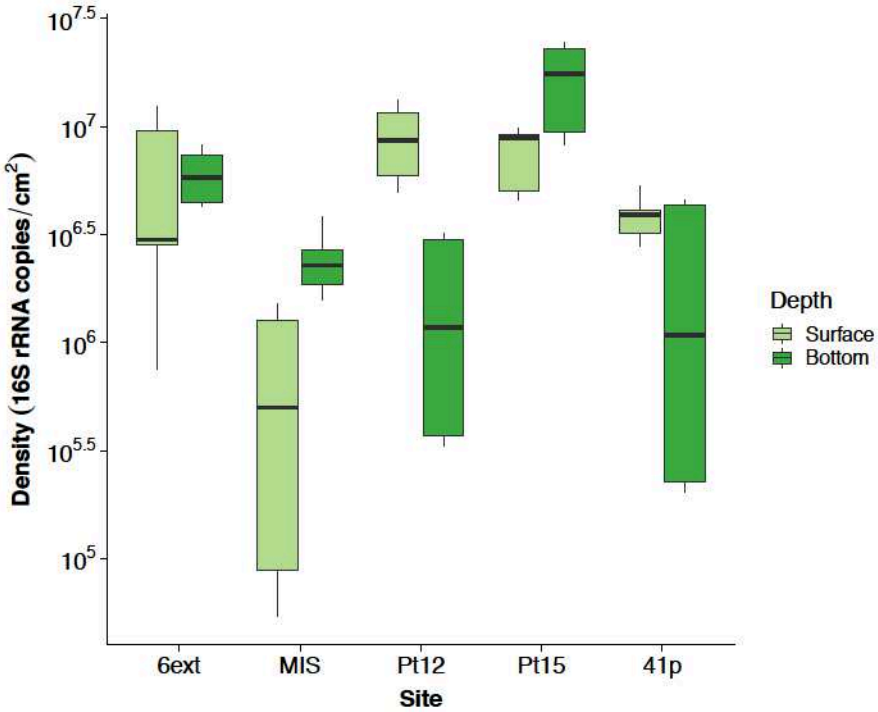


Figure D- 4 Biofilm microbial densities (cell.cm²) in surface (light green) and bottom (dark green) polycarbonate plates at the different sampling sites determined by qPCR.

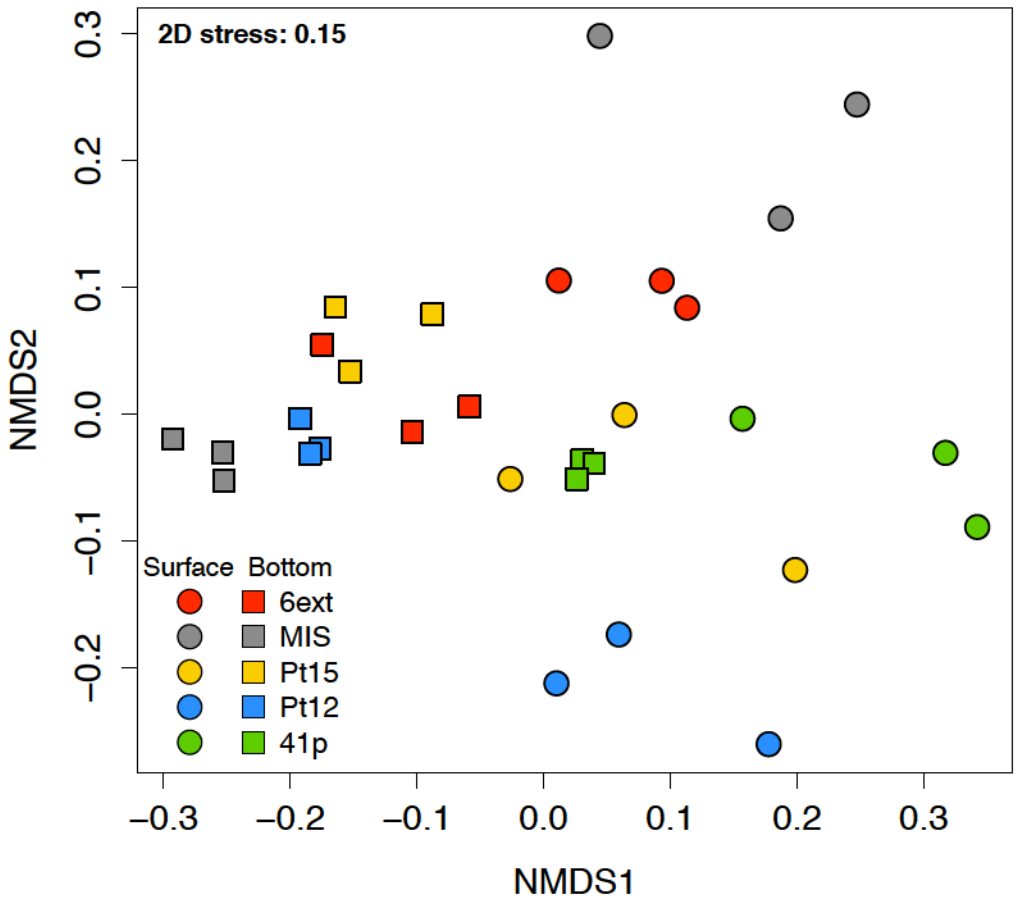


Figure D- 5 Nonmetric dimensional scaling (nMDS) ordination based on Bray-Curtis dissimilarity for 16S rRNA gene libraries between the different sampling sites and sampling depths.

D.3. Supplementary tables

Table D- 1 Samples characteristics in Toulon Bay.

Sample name	Site	Depth	Latitude (°N)	Longitude (°E)	No. of raw amplicons	No. of amplicons after filtering	No. of OTUs
41p_S	41p	Surface	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	31090	24391	470
41p_S1	41p	Surface	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	19130	15186	1273
41p_S2	41p	Surface	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	24135	19041	1349
41p_S3	41p	Surface	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	38830	28240	1442
41p_B	41p	Bottom	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	27021	21754	439
41p_B1	41p	Bottom	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	41518	29254	1662
41p_B2	41p	Bottom	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	38056	15811	1537
41p_B3	41p	Bottom	43° 4'21.74"	5°57'21.48"	29235	20540	1640
Pt15_S	Pt15	Surface	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	48244	36675	441
Pt15_S1	Pt15	Surface	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	65410	37044	1739
Pt15_S2	Pt15	Surface	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	42561	31438	1637
Pt15_S3	Pt15	Surface	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	43641	30362	1428
Pt15_B	Pt15	Bottom	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	28125	21500	424
Pt15_B1	Pt15	Bottom	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	20433	10336	1719
Pt15_B2	Pt15	Bottom	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	25131	8647	1737
Pt15_B3	Pt15	Bottom	43° 5'24.82"	5°54'39.05"	27684	15758	1989
Pt12_S	Pt12	Surface	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	23279	17308	406
Pt12_S1	Pt12	Surface	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	18631	12258	1450
Pt12_S2	Pt12	Surface	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	15387	10164	1438
Pt12_S3	Pt12	Surface	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	22721	16207	1244
Pt12_B	Pt12	Bottom	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	38367	26656	469
Pt12_B1	Pt12	Bottom	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	25947	19365	1666
Pt12_B2	Pt12	Bottom	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	25992	18822	1578
Pt12_B3	Pt12	Bottom	43° 6'34.96"	5°55'41.09"	30137	18778	1738
MIS_S	MIS	Surface	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	26720	21205	442
MIS_S1	MIS	Surface	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	11297	5828	782
MIS_S2	MIS	Surface	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	19638	11971	1100
MIS_S3	MIS	Surface	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	10571	6279	760
MIS_B	MIS	Bottom	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	32551	25934	412
MIS_B1	MIS	Bottom	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	34347	25032	1663
MIS_B2	MIS	Bottom	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	19239	14098	1676
MIS_B3	MIS	Bottom	43° 7'9.37"	5°54'40.07"	16679	11618	1780
6ext_S	6ext	Surface	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	31290	22615	415
6ext_S1	6ext	Surface	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	22281	15624	1608
6ext_S2	6ext	Surface	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	32959	22598	1677
6ext_S3	6ext	Surface	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	43457	24926	1695

6ext_B	6ext	Bottom	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	28337	21647	496
6ext_B1	6ext	Bottom	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	24539	17898	1639
6ext_B2	6ext	Bottom	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	25837	17138	1690
6ext_B3	6ext	Bottom	43° 7'8.65"	5°54'57.31"	33373	17531	1727

Table D- 2 Environmental (biotic and abiotic) characteristics of seawater samples in June 2015. The values represent the mean between sampling dates (n = 5) and the standard deviation for each parameter.

	41p		Pt15		Pt12		MIS		6ext	
	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom
Temperature	22 ± 1.4	19 ± 1.7	22 ± 1.6	21 ± 1.5	22 ± 1.6	21 ± 1.4	23 ± 1.3	21 ± 1.4	23 ± 1.3	21 ± 1.8
Salinity	39 ± 0.13	39 ± 0.05	39 ± 0.49	39 ± 0.15	39 ± 0.58	39 ± 0.15	38 ± 0.68	39 ± 0.07	38 ± 0.60	39 ± 0.09
Chlorophyll *a*	0.20 ± 0.06	0.37 ± 0.11	0.89 ± 0.30	1.3 ± 0.20	0.90 ± 0.57	2.0 ± 1.0	0.99 ± 0.31	2.6 ± 1.1	1.2 ± 0.51	3.5 ± 1.8
DOC	1.2 ± 0.14	1.1 ± 0.09	1.2 ± 0.15	1.2 ± 0.10	1.3 ± 0.12	1.2 ± 0.10	1.3 ± 0.24	1.2 ± 0.10	1.4 ± 0.16	1.2 ± 0.08
TN	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.02
Prokaryotes	398617 ± 22586	384533 ± 62397	925820 ± 254190	675760 ± 122875	677860 ± 171198	677200 ± 81175	730320 ± 240343	848360 ± 183571	1036880 ± 348162	1138800 ± 271236
Al	4788 ± 4436	4852 ± 4581	4419 ± 4955	4483 ± 5136	4742 ± 5191	4312 ± 5093	4157 ± 4651	4142 ± 4630	4216 ± 4475	3472 ± 4969
As	25 ± 2.4	27 ± 4.4	28 ± 2.7	27 ± 4.4	25 ± 5.0	24 ± 4.7	25 ± 4.9	26 ± 3.0	30 ± 3.8	27 ± 5.9
Ba	59 ± 2.2	59 ± 2.9	61 ± 2.3	60 ± 2.1	61 ± 2.5	62 ± 7.9	63 ± 3.7	60 ± 2.1	69 ± 4.0	68 ± 8.3
Be	46 ± 25	45 ± 26	48 ± 26	44 ± 5.9	49 ± 19	48 ± 14	52 ± 12	59 ± 28	63 ± 32	63 ± 33
Cr	7.2 ± 4.7	7.0 ± 2.7	7.1 ± 3.4	7.0 ± 1.9	6.7 ± 2.1	8.0 ± 3.5	7.7 ± 2.0	6.4 ± 2.4	6.1 ± 1.4	5.0 ± 1.1
Cs	2.5 ± 0.10	2.5 ± 0.12	2.5 ± 0.09	2.5 ± 0.09	2.5 ± 0.09	2.5 ± 0.07	2.5 ± 0.13	2.5 ± 0.04	2.6 ± 0.11	2.5 ± 0.05
Fe	64 ± 41	64 ± 48	68 ± 50	130 ± 92	63 ± 52	66 ± 54	63 ± 42	66 ± 39	70 ± 37	69 ± 46
Li	28806 ± 2049	28921 ± 3253	29658 ± 4865	29403 ± 4373	29393 ± 4157	28757 ± 4732	27747 ± 3817	28355 ± 3057	28235 ± 2619	27813 ± 2526
Mn	14 ± 1.8	14 ± 4.3	24 ± 7.9	24 ± 7.1	25 ± 7.2	28 ± 14	26 ± 7.5	24 ± 6.0	30 ± 5.6	48 ± 6.5
Mo95	164 ± 9.6	162 ± 7.1	162 ± 8.7	161 ± 7.4	160 ± 7.5	160 ± 4.9	159 ± 6.0	162 ± 6.1	164 ± 8.7	161 ± 5.0

Table D- 2 Continued

	41p		Pt15		Pt12		MIS		6ext	
	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom
Rb	1476 ± 20	1477 ± 46	1479 ± 73	1475 ± 61	1468.60 ± 56.33	1461 ± 63	1437 ± 54	1460 ± 40	1460 ± 49	1455 ± 35
Sb	3.6 ± 0.27	3.5 ± 0.23	4.1 ± 0.79	4.0 ± 0.79	4.1 ± 0.69	4.6 ± 1.3	4.3 ± 0.90	4.2 ± 0.84	5.4 ± 0.82	5.9 ± 1.9
Sn	1.7 ± 0.40	1.8 ± 0.46	1.8 ± 0.49	1.7 ± 0.48	2.2 ± 1.6	1.7 ± 0.56	1.7 ± 0.50	1.6 ± 0.45	1.9 ± 0.48	1.8 ± 0.37
Sr	106041 ± 1881	105845 ± 3392	106071 ± 4756	105787 ± 3868	105608 ± 4101	104734 ± 3787	103183 ± 4011	104936 ± 2494	104297 ± 3280	104835 ± 2195
Ti	16 ± 12	13 ± 10	16 ± 13	13 ± 12	14 ± 14	13 ± 15	15 ± 15	17 ± 15	14 ± 12	13 ± 15
U	16 ± 1.3	15 ± 1.6	15 ± 2.0	15 ± 1.9	15 ± 1.7	15 ± 2.1	15 ± 1.4	16 ± 1.3	16 ± 1.1	16 ± 0.40
V	43 ± 2.2	44 ± 4.5	44 ± 5.2	44 ± 4.1	43 ± 4.6	42 ± 4.4	42 ± 4.3	42 ± 3.4	43 ± 4.1	42 ± 3.4

Table D- 3 Dissolved and labile trace metal concentrations of seawater samples in June 2015. The values represent the mean between sampling dates (n = 5) and the standard deviation for each parameter.

	41p		Pt15		Pt12		MIS		6ext	
	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom	Surface	Bottom
$[Cd]_{dissolved}$ (nM)	0.063 ± 0.017	0.060 ± 0.022	0.088 ± 0.017	0.083 ± 0.0081	0.12 ± 0.029	0.13 ± 0.11	0.14 ± 0.056	0.13 ± 0.053	0.15 ± 0.019	0.17 ± 0.043
$[Cd]^{DGT}_{Labile}$ (nM)	0.046 ± 0.0021	0.056 ± 0.00	0.059 ± 0.00	0.051 ± 0.0017	0.066 ± 0.0024	0.058 ± 0.00	0.081 ± 0.0034	0.062 ± 0.0018	0.10 ± 0.0029	0.10 ± 0.0039
$[Cu]_{dissolved}$ (nM)	5.1 ± 1.2	4.2 ± 0.95	25 ± 6.6	12 ± 1.8	34 ± 7.9	30 ± 23	72± 19	28 ± 16	93 ± 22	26 ± 10
$[Cu]^{DGT}_{Labile}$ (nM)	1.4 ± 0.032	0.93 ± 0.047	7.1 ± 0.22	3.4 ± 0.16	12 ± 0.52	6.9 ± 0.063	25± 1.4	8.2 ± 0.65	29 ± 0.87	12 ± 0.44
$[Pb]_{dissolved}$ (nM)	0.26 ± 0.13	0.32 ± 0.086	1.1 ± 0.19	0.65 ± 0.17	1.5 ± 0.35	2.2 ± 2.3	1.4 ± 0.19	1.7 ± 0.18	4.6 ± 0.87	7.2 ± 6.1
$[Pb]^{DGT}_{Labile}$ (nM)	0.017 ± 0.00	0.015 ± 0.00	0.054 ± 0.00	0.037 ± 0.00	0.083 ± 0.0030	0.080 ± 0.00	0.086 ± 0.0025	0.098 ± 0.0015	0.40 ± 0.014	0.31 ± 0.010
$[Zn]_{dissolved}$ (nM)	18 ± 8.5	15 ± 5.1	49 ± 10	24 ± 4.7	61 ± 13	108 ± 152	130 ± 28	70 ± 38	290 ± 46	166 ± 81
$[Zn]^{DGT}_{Labile}$ (nM)	6.7 ± 1.5	4.9 ± 0.15	25 ± 1.7	16 ± 3.1	37 ± 2.9	25 ± 1.7	71 ± 5.7	32 ± 0.15	164 ± 4.7	99 ± 5.1

Table D- 4 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) examining the effects of the factors "Site", "Lifestyle" and "Depth" on the bacterial communities. Key to abbreviations and column headings: D.f, degrees of freedom; MS, mean square; F, F ratio; R2, coefficient of determination; P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Taxonomic rank	Source of variation	D.f	MS	F	R2	P	Significance
Phylum	Site	4	0.019737	7.490	0.13659	0.001	***
	Lifestyle	1	0.224852	85.326	0.38903	0.001	***
	Depth	1	0.029882	11.339	0.05170	0.002	**
	Site:Lifestyle	4	0.027082	10.277	0.18743	0.001	***
	Site:Depth	4	0.012060	4.577	0.08346	0.001	***
	Lifestyle:Depth	1	0.010746	4.078	0.01859	0.020	*
	Site:Lifestyle:Depth	4	0.006069	2.303	0.04200	0.015	*
	Residuals	20	0.002635	0.09119			
Class	Site	4	0.04588	8.316	0.13310	0.001	***
	Lifestyle	1	0.55500	100.607	0.40255	0.001	***
	Depth	1	0.10884	19.730	0.07894	0.001	***
	Site:Lifestyle	4	0.04704	8.528	0.13648	0.001	***
	Site:Depth	4	0.03424	6.206	0.09933	0.001	***
	Lifestyle:Depth	1	0.05365	9.726	0.03891	0.001	***
	Site:Lifestyle:Depth	4	0.01057	1.916	0.03066	0.045	*
	Residuals	20	0.00552	0.08002			
Order	Site	4	0.05791	9.147	0.09456	0.001	***
	Lifestyle	1	1.41571	223.626	0.57794	0.001	***
	Depth	1	0.11711	18.499	0.04781	0.001	***
	Site:Lifestyle	4	0.07389	11.672	0.12066	0.001	***
	Site:Depth	4	0.03965	6.264	0.06475	0.001	***
	Lifestyle:Depth	1	0.04722	7.460	0.01928	0.002	**
	Site:Lifestyle:Depth	4	0.01428	2.255	0.02332	0.039	*
	Residuals	20	0.00633	0.05169			

Table D- 4 Continued

Taxonomic rank	Source of variation	D.f	MS	F	R2	P	Significance
Family	Site	4	0.04076	6.820	0.08150	0.001	***
	Lifestyle	1	1.12012	187.399	0.55986	0.001	***
	Depth	1	0.11508	19.253	0.05752	0.001	***
	Site:Lifestyle	4	0.06283	10.512	0.12562	0.001	***
	Site:Depth	4	0.03443	5.760	0.06883	0.001	***
	Lifestyle:Depth	1	0.04781	7.998	0.02390	0.002	**
	Site:Lifestyle:Depth	4	0.01152	1.927	0.02303	0.054	.
	Residuals	20	0.00598	0.05975			
Genus	Site	4	0.04057	9.369	0.08104	0.001	***
	Lifestyle	1	1.31058	302.628	0.65437	0.001	***
	Depth	1	0.13668	31.562	0.06825	0.001	***
	Site:Lifestyle	4	0.02516	5.809	0.05024	0.001	***
	Site:Depth	4	0.02733	6.310	0.05458	0.001	***
	Lifestyle:Depth	1	0.06001	13.858	0.02996	0.001	***
	Site:Lifestyle:Depth	4	0.00917	2.117	0.01831	0.037	*
	Residuals	20	0.00433	0.04325			

Table D- 5 Results of linear discriminant analysis test to identify differentially abundant OTUs for sampling sites at the surface of seawater column comparisons using LEfSe (Log LDA score > 2; p < 0.05).

Site	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	LDA score	P
41p	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Croceitalea	4,13	0,01
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Other	3,87	0,02
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Polaribacter4	3,63	0,03
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Tenacibaculum	4,11	0,02
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Winogradskyella	3,82	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Incertae Sedis	-	-	3,50	0,04
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Pseudahrensia	3,47	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ascidiaceihabitans	3,47	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	-	3,73	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	-	3,72	0,05
Pt15	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	-	-	3,39	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Halieaceae	Haliea	3,12	0,03
Pt12	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	Lewinella	4,36	0,01
	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	Portibacter	3,59	0,02
	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Unc. Bact.	Other	3,75	0,03
	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Unc. Bact.	Unc. Bact.	3,75	0,03
	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria	SubsectionI	FamilyI	Synechococcus	3,52	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Other	4,36	0,03
MIS	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria	SubsectionIII	FamilyI	Leptolyngbya	3,33	0,04
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Unc. Bact.	4,46	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Spongiibacteraceae	BD1_7clade	3,43	0,02
	Bacteria	Verrucomicrobia	Opitutae	Puniceicoccales	Puniceicoccaceae	Lentimonas	4,03	0,02
	Bacteria	Verrucomicrobia	R76_B128	Other	Other	Other	3,30	0,02
6ext	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	uncultured	3,54	0,03
	Bacteria	Planctomycetes	Phycisphaerae	Phycisphaerales	Phycisphaeraceae	SM1A02	3,89	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Parvularculales	Parvularculaceae	Parvularcula	3,36	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Tateyamaria	3,96	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Erythrobacter	3,87	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Other	3,68	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Parasphingopyxis	3,23	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Incertae Sedis	Unknown Family	Unc. Bact.	3,49	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	JTB255 marine benthic group	Unc. Bact.	3,67	0,01
	Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	DEV007	Unc. Bact.	3,24	0,03

Table D- 6 Results of linear discriminant analysis test to identify differentially abundant OTUs for sampling sites at the bottom of seawater column comparisons using LEfSe (Log LDA score > 2; p < 0.05).

Site	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	LDA score	P
41p	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	-	3,60	0,04
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Crocinitomix	3,12	0,03
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Croceitalea	4,13	0,02
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Polaribacter4	3,82	0,03
	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Tenacibaculum	3,59	0,05
	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	Other	3,08	0,03
	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Unc. Bact.	Unc. Bact.	3,57	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	uncultured	3,76	0,04
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Ruegeria	3,43	0,05
	Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Rubritaleaceae	Rubritalea	3,39	0,02
Pt15	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	Lewinella	3,79	0,02
	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteria	SubsectionIII	FamilyI	-	3,39	0,04
	Bacteria	Planctomycetes	OM190	Unc. Bact.	Unc. Bact.	Unc. Bact.	3,44	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	-	-	3,40	0,02
Pt12	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muriicola	3,49	0,01
	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Rhodopirellula	3,61	0,02
	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Rubripirellula	3,52	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Filomicrobium	3,47	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Methyloceanibacter	3,34	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Rhodobium	3,19	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobulbaceae	Unc. Bact.	3,63	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Sva0071	Other	Other	3,22	0,01
	Bacteria	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	DEV007	Unc. Bact.	3,43	0,02
MIS	Bacteria	Acidobacteria	Holophagae	Subgroup10	Sva0725	Unc. Bact.	3,20	0,02
	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	OM1clade	Unc. Bact.	3,22	0,01
	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Blastopirellula	3,92	0,03
	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Planctomyces	3,49	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Sandaracinaceae	Unc. Bact.	3,39	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Halieaceae	OM60_NOR5_clade	3,50	0,04
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Incertae Sedis	Unknown Family	Unc. Bact.	3,76	0,01
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Unc. Bact.	Unc. Bact.	Unc. Bact.	3,16	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	JTB255 marine benthic group	Unc. Bact.	3,03	0,03
6ext	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Aquibacter	3,73	0,03
	Bacteria	Planctomycetes	Phycisphaerae	Phycisphaerales	Phycisphaeraceae	SM1A02	3,33	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Tateyamaria	3,43	0,03
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Unc. Bact.	4,14	0,02
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	-	-	3,44	0,04
	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Parasphingopyxis	3,26	0,02

ANNEXE E. COMPLÉMENTS À L'ARTICLE 5

E.1. Supplementary figures

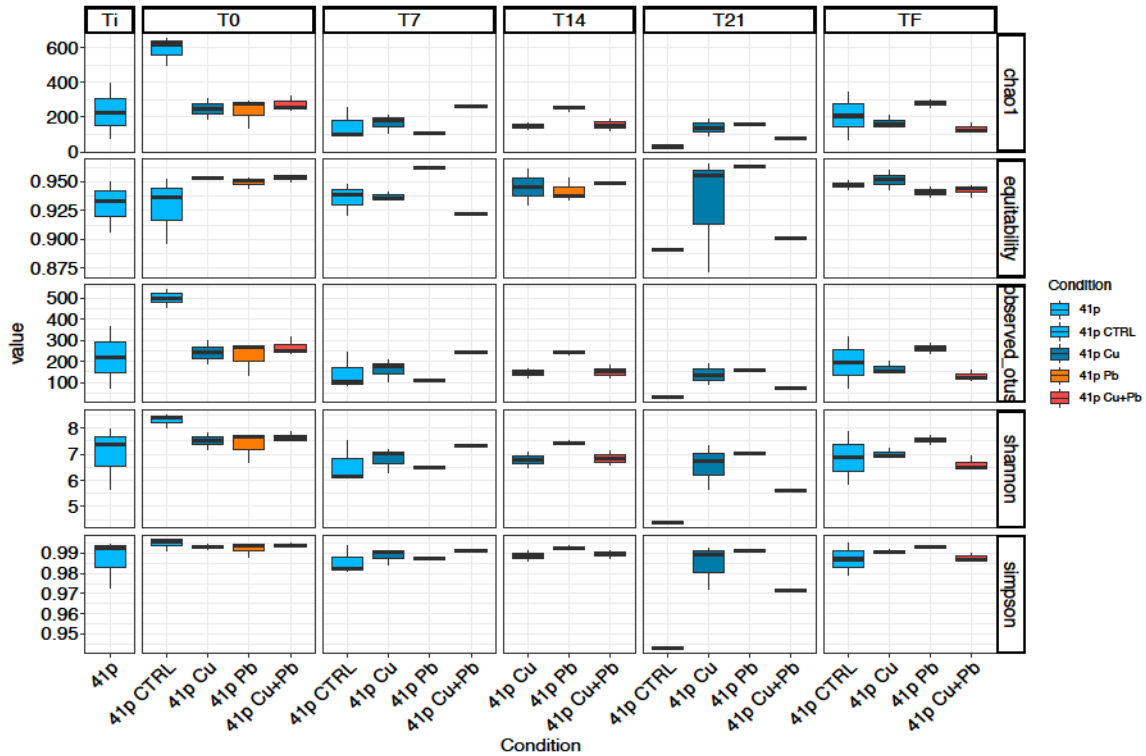


Figure E- 1 Alpha-diversity descriptors including chao1, equitability, Observed OTU, Shannon, Simpson calculated from 16S rRNA OTU table along each condition sample and each sampling time for the first mesocosm experiment. Upper and lower lines correspond to the first and third quartile of the distribution of values. The median values are shown with horizontal black wide lines. Outliers are displayed as dots.

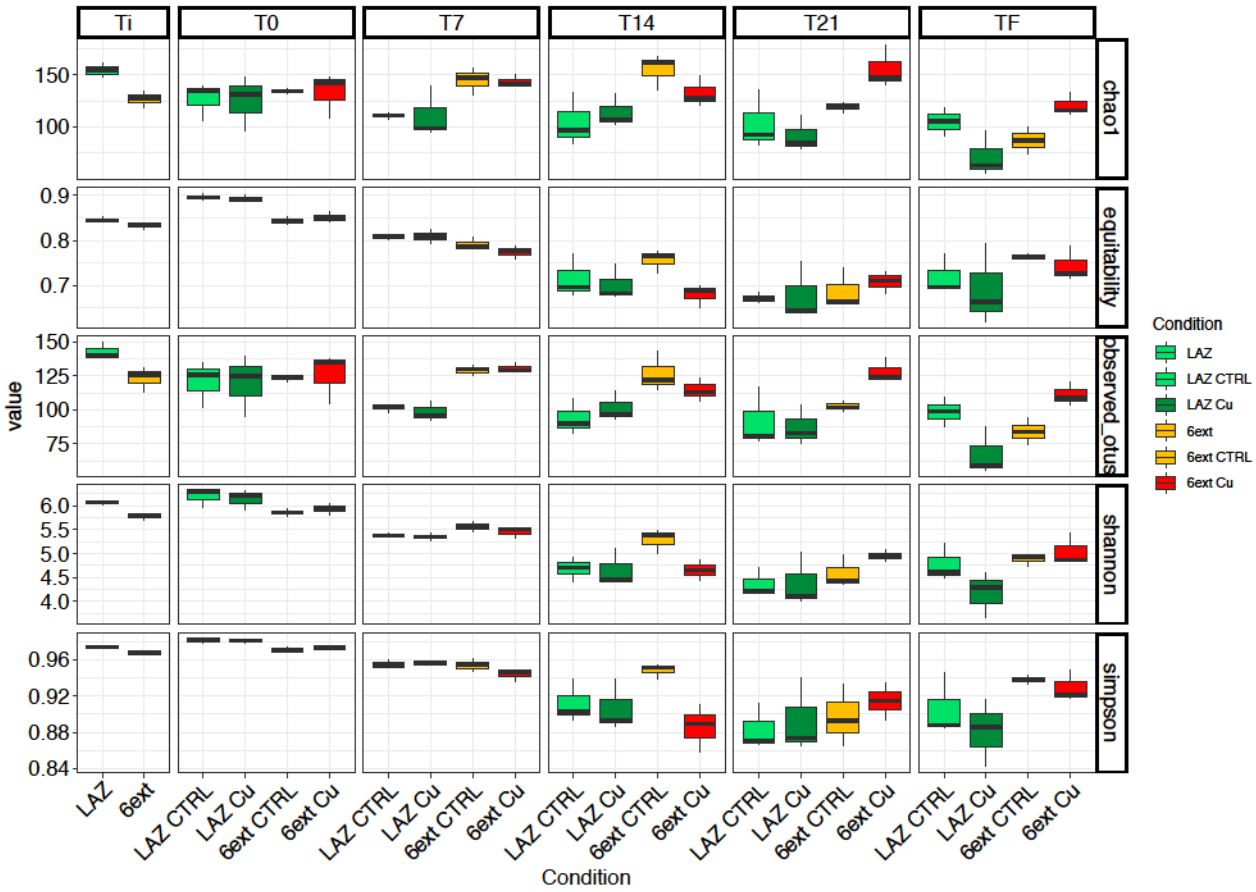


Figure E- 2 Alpha-diversity descriptors including chao1, equitability, Observed OTU, Shannon, Simpson calculated from 16S rRNA OTU table along each condition sample and each sampling time for the first mesocosm experiment. Upper and lower lines correspond to the first and third quartile of the distribution of values. The median values are shown with horizontal black wide lines. Outliers are displayed as dots.

E.2. Supplementary tables

Table E- 1 Samples characteristics and final check of DADA2 progress for both mesocosm experiments.

Sample name	Mesocosm experiment	Treatment	Condition	Time	No. of raw amplicons	No. of amplicons after filtering	No. of amplicons after merging	No. of amplicons after removing chimera	Statistical analysis	No. Of ASV
Impreci_1_Tm14A_41p	ME 1	41p SW	41p A	Ti	44959	44423	39190	21623	X	217
Impreci_1_Tm14B_41p	ME 1	41p SW	41p B	Ti	8795	8706	6047	3662		76
Impreci_1_Tm14C_41p	ME 1	41p SW	41p C	Ti	199111	196800	182803	76893	X	364
Impreci_1_T0_1A	ME 1	41p CTRL	1A	T0	357990	353773	334784	122963	X	499
Impreci_1_T0_1B	ME 1	41p CTRL	1B	T0	451115	445862	417719	160028	X	538
Impreci_1_T0_1C	ME 1	41p CTRL	1C	T0	110423	109151	99905	51197	X	454
Impreci_1_T0_2A	ME 1	41p Cu	2A	T0	1019	1007	385	273		
Impreci_1_T0_2B	ME 1	41p Cu	2B	T0	43599	43090	36795	21136	X	296
Impreci_1_T0_2C	ME 1	41p Cu	2C	T0	19655	19413	16094	11458	X	188
Impreci_1_T0_3A	ME 1	41p Pb	3A	T0	34347	33988	30344	19204	X	274
Impreci_1_T0_3B	ME 1	41p Pb	3B	T0	34723	34301	30078	20382	X	265
Impreci_1_T0_3C	ME 1	41p Pb	3C	T0	15177	15013	12081	8855	X	135
Impreci_1_T0_4A	ME 1	41p Cu+Pb	4A	T0	26769	26429	23117	14942	X	237
Impreci_1_T0_4B	ME 1	41p Cu+Pb	4B	T0	35034	34696	29464	18886	X	249
Impreci_1_T0_4C	ME 1	41p Cu+Pb	4C	T0	45763	45251	41035	24258	X	315
Impreci_1_T7_1A	ME 1	41p CTRL	1A	T7	8513	8390	7079	4497	X	89
Impreci_1_T7_1B	ME 1	41p CTRL	1B	T7	34520	34113	31692	16754	X	245
Impreci_1_T7_1C	ME 1	41p CTRL	1C	T7	8882	8803	7372	5501	X	101
Impreci_1_T7_2A	ME 1	41p Cu	2A	T7	12252	12122	10206	6212	X	106
Impreci_1_T7_2B	ME 1	41p Cu	2B	T7	18542	18345	15959	9273	X	176
Impreci_1_T7_2C	ME 1	41p Cu	2C	T7	23465	23220	21349	11393	X	205
Impreci_1_T7_3B	ME 1	41p Pb	3B	T7	11700	11564	10086	6077	X	109
Impreci_1_T7_3C	ME 1	41p Pb	3C	T7	2754	2720	1976	1563		
Impreci_1_T7_4A	ME 1	41p Cu+Pb	4A	T7	3547	3507	2896	2118		
Impreci_1_T7_4B	ME 1	41p Cu+Pb	4B	T7	60601	59996	57298	30676	X	243
Impreci_1_T7_4C	ME 1	41p Cu+Pb	4C	T7	4817	4773	3975	2708		
Impreci_1_T14_1A	ME 1	41p CTRL	1A	T14	757	745	352	248		
Impreci_1_T14_1B	ME 1	41p CTRL	1B	T14	1883	1867	1188	925		
Impreci_1_T14_1C	ME 1	41p CTRL	1C	T14	1848	1834	1368	1261		
Impreci_1_T14_2A	ME 1	41p Cu	2A	T14	18767	18560	16976	10048	X	167
Impreci_1_T14_2B	ME 1	41p Cu	2B	T14	2200	2173	1457	1098		
Impreci_1_T14_2C	ME 1	41p Cu	2C	T14	8359	8261	6681	4642	X	125
Impreci_1_T14_3A	ME 1	41p Pb	3A	T14	29207	28893	25721	14373	X	246
Impreci_1_T14_3B	ME 1	41p Pb	3B	T14	28366	28028	24982	14628	X	233
Impreci_1_T14_3C	ME 1	41p Pb	3C	T14	24352	24040	21957	12531	X	241

Impreci_1_T14_4A	ME 1	41p Cu+Pb	4A	T14	6350	6280	5509	3363		
Impreci_1_T14_4B	ME 1	41p Cu+Pb	4B	T14	29521	29248	27076	14879	X	181
Impreci_1_T14_4C	ME 1	41p Cu+Pb	4C	T14	13373	13223	11958	7215	X	121
Impreci_1_T21_1B	ME 1	41p CTRL	1B	T21	8676	8567	7149	5038		
Impreci_1_T21_1C	ME 1	41p CTRL	1C	T21	17761	17297	16156	7680	X	30
Impreci_1_T21_2A	ME 1	41p Cu	2A	T21	14238	13906	12978	6820	X	90
Impreci_1_T21_2B	ME 1	41p Cu	2B	T21	38051	37659	35755	18597	X	190
Impreci_1_T21_2C	ME 1	41p Cu	2C	T21	14928	14762	13782	8038	X	134
Impreci_1_T21_3B	ME 1	41p Pb	3B	T21	22150	21867	20076	10239	X	157
Impreci_1_T21_3C	ME 1	41p Pb	3C	T21	3534	3459	2352	1954		
Impreci_1_T21_4A	ME 1	41p Cu+Pb	4A	T21	5006	4947	3229	2599		
Impreci_1_T21_4B	ME 1	41p Cu+Pb	4B	TF	15258	15010	14045	6361	X	75
Impreci_1_TF_1B	ME 1	41p CTRL	1B	TF	48447	47880	44780	24397	X	314
Impreci_1_TF_1C	ME 1	41p CTRL	1C	TF	14138	13948	10685	8033	X	74
Impreci_1_TF_2A	ME 1	41p Cu	2A	TF	20833	20596	19235	10700	X	155
Impreci_1_TF_2B	ME 1	41p Cu	2B	TF	26064	25690	23865	14413	X	202
Impreci_1_TF_2C	ME 1	41p Cu	2C	TF	15827	15636	14432	8725	X	148
Impreci_1_TF_3A	ME 1	41p Pb	3A	TF	24353	24058	22088	12371	X	237
Impreci_1_TF_3B	ME 1	41p Pb	3B	TF	33403	33092	30597	16700	X	288
Impreci_1_TF_3C	ME 1	41p Pb	3C	TF	1457	1439	1194	1012		
Impreci_1_TF_4A	ME 1	41p Cu+Pb	4A	TF	17836	17648	16310	9395	X	113
Impreci_1_TF_4B	ME 1	41p Cu+Pb	4B	TF	28789	28517	26737	14095	X	159
Impreci_1_TF_4C	ME 1	41p Cu+Pb	4C	TF	16686	16530	15008	8830	X	121
Impreci_2_Tm14A_LAZ	ME 2	LAZ SW	LAZ A	Ti	86400	83299	80153	75632	X	139
Impreci_2_Tm14B_LAZ	ME 2	LAZ SW	LAZ B	Ti	74137	71448	68879	64910	X	140
Impreci_2_Tm14C_LAZ	ME 2	LAZ SW	LAZ C	Ti	92516	89257	85937	80880	X	150
Impreci_2_Tm14A_6ext	ME 2	6ext SW	6ext A	Ti	80126	77002	73811	70575	X	126
Impreci_2_Tm14B_6ext	ME 2	6ext SW	6ext B	Ti	50922	48973	46978	44927	X	113
Impreci_2_Tm14C_6ext	ME 2	6ext SW	6ext C	Ti	94492	90861	87355	83348	X	131
Impreci_2_T0_1A	ME 2	LAZ CTRL	1A	T0	39341	37885	36427	35133	X	135
Impreci_2_T0_1B	ME 2	LAZ CTRL	1B	T0	23874	22920	21391	20549	X	102
Impreci_2_T0_1C	ME 2	LAZ CTRL	1C	T0	30803	29689	27745	26485	X	126
Impreci_2_T0_2A	ME 2	LAZ Cu	2A	T0	29828	28794	27335	26287	X	125
Impreci_2_T0_2B	ME 2	LAZ Cu	2B	T0	46718	45148	43412	41794	X	140
Impreci_2_T0_2C	ME 2	LAZ Cu	2C	T0	19517	18788	17251	16671	X	95
Impreci_2_T0_3A	ME 2	6ext CTRL	3A	T0	41081	39676	37942	37247	X	125
Impreci_2_T0_3B	ME 2	6ext CTRL	3B	T0	37976	36708	35049	34492	X	121
Impreci_2_T0_3C	ME 2	6ext CTRL	3C	T0	37900	36628	35193	34602	X	124
Impreci_2_T0_4A	ME 2	6ext Cu	4A	T0	22443	21631	20295	19875	X	105
Impreci_2_T0_4B	ME 2	6ext Cu	4B	T0	43313	41996	40453	39742	X	135
Impreci_2_T0_4C	ME 2	6ext Cu	4C	T0	48654	46846	45168	44229	X	138
Impreci_2_T7_1A	ME 2	LAZ CTRL	1A	T7	34453	33289	31752	30499	X	104
Impreci_2_T7_1B	ME 2	LAZ CTRL	1B	T7	30182	29185	27861	26871	X	103

Impreci_2_T7_1C	ME 2	LAZ CTRL	1C	T7	31491	30362	28834	27886	X	98
Impreci_2_T7_2A	ME 2	LAZ Cu	2A	T7	36527	35348	33635	32515	X	96
Impreci_2_T7_2B	ME 2	LAZ Cu	2B	T7	29762	28743	27461	26528	X	92
Impreci_2_T7_2C	ME 2	LAZ Cu	2C	T7	40979	39541	38126	36535	X	107
Impreci_2_T7_3A	ME 2	6ext CTRL	3A	T7	48195	46597	45235	44459	X	130
Impreci_2_T7_3B	ME 2	6ext CTRL	3B	T7	55500	53813	52327	51120	X	125
Impreci_2_T7_3C	ME 2	6ext CTRL	3C	T7	44163	42628	40891	40129	X	133
Impreci_2_T7_4A	ME 2	6ext Cu	4A	T7	45592	44160	42501	41764	X	128
Impreci_2_T7_4B	ME 2	6ext Cu	4B	T7	62902	60934	59105	58042	X	135
Impreci_2_T7_4C	ME 2	6ext Cu	4C	T7	52159	50586	49045	48405	X	129
Impreci_2_T14_1A	ME 2	LAZ CTRL	1A	T14	22422	21633	20374	19571	X	83
Impreci_2_T14_1B	ME 2	LAZ CTRL	1B	T14	53576	51712	49748	48651	X	108
Impreci_2_T14_1C	ME 2	LAZ CTRL	1C	T14	34680	33363	31488	30741	X	90
Impreci_2_T14_2A	ME 2	LAZ Cu	2A	T14	79637	77026	75133	70431	X	114
Impreci_2_T14_2B	ME 2	LAZ Cu	2B	T14	49294	47894	46533	42497	X	93
Impreci_2_T14_2C	ME 2	LAZ Cu	2C	T14	56047	54387	52772	47868	X	97
Impreci_2_T14_3A	ME 2	6ext CTRL	3A	T14	66566	64612	63062	60802	X	115
Impreci_2_T14_3B	ME 2	6ext CTRL	3B	T14	81356	78667	76417	73789	X	143
Impreci_2_T14_3C	ME 2	6ext CTRL	3C	T14	53401	51612	49673	48314	X	122
Impreci_2_T14_4A	ME 2	6ext Cu	4A	T14	68837	66798	64740	62937	X	124
Impreci_2_T14_4B	ME 2	6ext Cu	4B	T14	38837	37674	36077	35376	X	107
Impreci_2_T14_4C	ME 2	6ext Cu	4C	T14	42911	41688	39801	39115	X	113
Impreci_2_T22_1A	ME 2	LAZ CTRL	1A	T22	28749	27563	25866	25347	X	81
Impreci_2_T22_1B	ME 2	LAZ CTRL	1B	T22	24493	23591	21760	21064	X	77
Impreci_2_T22_1C	ME 2	LAZ CTRL	1C	T22	121826	117041	113763	110874	X	117
Impreci_2_T22_2A	ME 2	LAZ Cu	2A	T22	44883	43364	41105	39486	X	104
Impreci_2_T22_2B	ME 2	LAZ Cu	2B	T22	56564	55015	53020	47914	X	75
Impreci_2_T22_2C	ME 2	LAZ Cu	2C	T22	66466	64693	63020	56964	X	83
Impreci_2_T22_3A	ME 2	6ext CTRL	3A	T22	123637	119614	117214	115332	X	102
Impreci_2_T22_3B	ME 2	6ext CTRL	3B	T22	56378	54669	52591	51467	X	99
Impreci_2_T22_3C	ME 2	6ext CTRL	3C	T22	49698	48289	46178	45322	X	107
Impreci_2_T22_4A	ME 2	6ext Cu	4A	T22	64684	62976	60791	59797	X	124
Impreci_2_T22_4B	ME 2	6ext Cu	4B	T22	129122	125300	121793	119942	X	139
Impreci_2_T22_4C	ME 2	6ext Cu	4C	T22	194865	189357	185705	181376	X	123
Impreci_2_TF_1A	ME 2	LAZ CTRL	1A	TF	63519	61201	59157	57810	X	109
Impreci_2_TF_1B	ME 2	LAZ CTRL	1B	TF	64252	61952	59913	58829	X	99
Impreci_2_TF_1C	ME 2	LAZ CTRL	1C	TF	30850	29667	28545	28021	X	88
Impreci_2_TF_2A	ME 2	LAZ Cu	2A	TF	8749	8362	7526	7327	X	56
Impreci_2_TF_2B	ME 2	LAZ Cu	2B	TF	29521	28621	27718	26524	X	59
Impreci_2_TF_2C	ME 2	LAZ Cu	2C	TF	45122	43711	42450	39382	X	88
Impreci_2_TF_3A	ME 2	6ext CTRL	3A	TF	29440	28457	27350	27068	X	84
Impreci_2_TF_3B	ME 2	6ext CTRL	3B	TF	19108	18455	17476	17217	X	74
Impreci_2_TF_3C	ME 2	6ext CTRL	3C	TF	26599	25722	24415	24180	X	94

Impreci_2_TF_4A	ME 2	6ext Cu	4A	TF	55137	53539	52003	51563	X	109
Impreci_2_TF_4B	ME 2	6ext Cu	4B	TF	38251	36978	35012	34483	X	121
Impreci_2_TF_4C	ME 2	6ext Cu	4C	TF	48197	46820	45489	44973	X	104

Table E- 2 Environmental characteristics of seawater samples of first mesocosm experiment. The values represent the mean between sampling replicates (n = 3) and the standard deviation for each parameter, except for ICP-MS trace metal measurements. Two-way analysis of variance (ANOVA) for environmental parameters of seawater across different conditions and sampling time.

Time	Condition	Temperature (°C)	pH -	Dissolved Oxygen (%)	DOC (mg C.L^{-1})	TN (mg N.L^{-1})	Total Cu (nM)	Total Pb (nM)	Total Zn (nM)
Ti	41p				0.83 ± 0.00	0.04 ± 0.004	2.44	0.13	5.34
T0	41p CTRL	19 ± 0.10	8.2 ± 0.01	110.5 ± 0.1	1.53 ± 0.01	0.13 ± 0.002	3.37	0.16	13.0
	41p Cu	19 ± 0.15	8.2 ± 0.01	110.9 ± 0.5	1.40 ± 0.01	0.13 ± 0.001	131	0.15	9.59
	41p Pb	19 ± 0.10	8.2 ± 0.02	110.9 ± 0.1	1.38 ± 0.00	0.09 ± 0.002	3.04	6.6	10.4
	41p Cu+Pb	20 ± 0.00	8.2 ± 0.01	111.0 ± 0.5	1.40 ± 0.01	0.15 ± 0.009	136	6.7	16.5
T7	41p CTRL	20 ± 0.06	8.2 ± 0.01	111.5 ± 0.1	1.30 ± 0.01	0.10 ± 0.005	-	-	-
	41p Cu	20 ± 0.06	8.2 ± 0.00	111.4 ± 0.0	1.26 ± 0.01	0.14 ± 0.005	-	-	-
	41p Pb	20 ± 0.12	8.2 ± 0.01	111.6 ± 0.6	1.29 ± 0.01	0.09 ± 0.003	-	-	-
	41p Cu+Pb	20 ± 0.15	8.2 ± 0.01	111.4 ± 0.1	1.24 ± 0.01	0.16 ± 0.006	-	-	-
T14	41p CTRL	21 ± 0.06	8.2 ± 0.01	110.8 ± 0.1	1.32 ± 0.01	0.11 ± 0.003	-	-	-
	41p Cu	21 ± 0.10	8.2 ± 0.01	111.0 ± 0.0	1.33 ± 0.00	0.17 ± 0.008	-	-	-
	41p Pb	21 ± 0.17	8.2 ± 0.00	110.9 ± 0.3	1.29 ± 0.01	0.10 ± 0.004	-	-	-
	41p Cu+Pb	22 ± 0.06	8.2 ± 0.00	110.7 ± 0.3	1.30 ± 0.00	0.16 ± 0.004	-	-	-
T21	41p CTRL	22 ± 0.10	8.3 ± 0.00	109.5 ± 0.1	1.30 ± 0.01	0.11 ± 0.003	-	-	-
	41p Cu	22 ± 0.10	8.3 ± 0.01	109.5 ± 0.2	1.34 ± 0.00	0.16 ± 0.003	-	-	-
	41p Pb	22 ± 0.06	8.3 ± 0.00	109.4 ± 0.1	1.27 ± 0.01	0.11 ± 0.003	-	-	-
	41p Cu+Pb	22 ± 0.06	8.2 ± 0.02	109.6 ± 0.2	1.33 ± 0.01	0.16 ± 0.005	-	-	-
TF	41p CTRL	20 ± 0.12	8.2 ± 0.02	109.0 ± 0.5	1.38 ± 0.01	0.11 ± 0.001	3.98	0.23	41.1
	41p Cu	21 ± 0.12	8.3 ± 0.01	109.5 ± 0.1	1.36 ± 0.01	0.17 ± 0.002	148	0.37	18.0
	41p Pb	21 ± 0.00	8.3 ± 0.02	109.0 ± 0.2	1.26 ± 0.01	0.11 ± 0.001	3.19	7.0	21.0
	41p Cu+Pb	21 ± 0.06	8.3 ± 0.01	109.2 ± 0.2	1.36 ± 0.01	0.16 ± 0.007	147	6.6	85.6
Condition	P	0.870	0.824	0.975	0.245	**0.002**	-	-	-
Time	P	**0.001**	**0.002**	**0.002**	**0.025**	0.809	-	-	-

Table E- 3 Environmental characteristics of seawater samples of second mesocosm experiment. The values represent the mean between sampling replicates (n = 3) and the standard deviation for each parameter. Two-way analysis of variance (ANOVA) for environmental parameters of seawater across different conditions and sampling time.

Time	Condition	Temperature (°C)	pH -	Dissolved Oxygen (%)	DOC (mg C.L^{-1})	TN (mg N.L^{-1})	Total Cu (nM)	Total Pb (nM)	Total Zn (nM)
Ti	LAZ	18 ± 0.00	7.7 ± 0.00	108.5 ± 0.1	0.95 ± 0.01	0.07 ± 0.000	15 ± 0.74	0.79 ± 0.05	39 ± 5.2
	6ext	19 ± 0.02	7.6 ± 0.00	120.0 ± 0.0	1.00 ± 0.02	0.08 ± 0.000	36 ± 0.86	2.32 ± 0.06	139 ± 14
T0	LAZ CTRL	19 ± 0.06	8.2 ± 0.01	103.9 ± 0.0	1.46 ± 0.02	0.08 ± 0.000	14 ± 1.5	6.83 ± 0.79	57 ± 8.0
	LAZ Cu	19 ± 0.29	8.2 ± 0.00	103.7 ± 0.2	1.46 ± 0.02	0.14 ± 0.000	147 ± 19	3.90 ± 0.55	113 ± 6.5
	6ext CTRL	19 ± 0.00	8.2 ± 0.01	103.7 ± 0.1	1.43 ± 0.02	0.09 ± 0.000	32 ± 3.5	3.12 ± 0.48	161 ± 15
	6ext Cu	19 ± 0.06	8.2 ± 0.01	103.7 ± 0.1	1.44 ± 0.03	0.13 ± 0.002	158 ± 12	3.09 ± 0.53	212 ± 19
T7	LAZ CTRL	20 ± 0.17	8.2 ± 0.01	104.8 ± 0.4	1.34 ± 0.01	0.10 ± 0.000	-	-	-
	LAZ Cu	20 ± 0.15	8.2 ± 0.00	104.8 ± 0.3	1.40 ± 0.02	0.16 ± 0.000	-	-	-
	6ext CTRL	20 ± 0.06	8.2 ± 0.01	104.8 ± 0.3	1.39 ± 0.02	0.10 ± 0.000	-	-	-
	6ext Cu	20 ± 0.10	8.2 ± 0.01	104.5 ± 0.1	1.37 ± 0.03	0.13 ± 0.003	-	-	-
T14	LAZ CTRL	21 ± 0.15	8.3 ± 0.00	104.9 ± 0.4	1.28 ± 0.01	0.09 ± 0.000	-	-	-
	LAZ Cu	21 ± 0.25	8.3 ± 0.00	104.6 ± 0.4	1.42 ± 0.02	0.17 ± 0.000	-	-	-
	6ext CTRL	21 ± 0.06	8.3 ± 0.01	105.0 ± 0.4	1.37 ± 0.02	0.10 ± 0.000	-	-	-
	6ext Cu	21 ± 0.15	8.3 ± 0.01	104.9 ± 0.2	1.29 ± 0.02	0.14 ± 0.004	-	-	-
T21	LAZ CTRL	22 ± 0.06	8.3 ± 0.01	104.6 ± 0.6	1.23 ± 0.02	0.09 ± 0.000	-	-	-
	LAZ Cu	22 ± 0.25	8.3 ± 0.01	104.0 ± 0.4	1.39 ± 0.01	0.18 ± 0.000	-	-	-
	6ext CTRL	22 ± 0.12	8.3 ± 0.01	104.4 ± 0.4	1.30 ± 0.02	0.11 ± 0.000	-	-	-
	6ext Cu	23 ± 0.06	8.3 ± 0.01	104.2 ± 0.2	1.20 ± 0.01	0.14 ± 0.002	-	-	-
TF	LAZ CTRL	23 ± 0.00	8.3 ± 0.02	102.8 ± 0.3	1.20 ± 0.01	0.09 ± 0.000	18 ± 0.42	5.42 ± 0.42	60 ± 1.8
	LAZ Cu	23 ± 0.00	8.3 ± 0.01	102.7 ± 0.3	1.38 ± 0.03	0.18 ± 0.000	164 ± 19	4.76 ± 0.41	119 ± 10
	6ext CTRL	23 ± 0.06	8.3 ± 0.01	102.5 ± 0.3	1.34 ± 0.02	0.12 ± 0.000	45 ± 5.0	6.11 ± 0.70	233 ± 21
	6ext Cu	23 ± 0.06	8.3 ± 0.00	102.1 ± 0.1	1.17 ± 0.02	0.14 ± 0.005	149 ± 11	11.1 ± 1.58	301 ± 25
Condition	P	0.543	0.323	0.318	0.08	**0.002**	-	-	-
Time	P	**0.002**	**0.007**	**0.006**	**0.048**	0.835	-	-	-

Table E- 4 Global (A) and pairwise (B) permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) examining the effects of the factors "Condition" and "Time" on the prokaryotic communities of the first mesocosm experiment. Key to abbreviations and column headings: D.f, degrees of freedom; MS, mean square; F, F ratio; R2, coefficient of determination; P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Taxonomic rank	Source of variation	D.f	MS	F	R^2	P	Signifiance
Phylum	Condition	4	0.07105	6.7901	0.19225	**0.001**	***
	Time	3	0.09513	12.1209	0.25738	**0.001**	***
	Condition:Time	9	0.15371	6.5285	0.41589	**0.001**	***
	Residuals	19	0.04970	0.13449			
Class	Condition	4	0.23714	6.4518	0.24066	**0.001**	***
	Time	4	0.15885	4.3217	0.16121	**0.001**	***
	Condition:Time	10	0.36885	4.0139	0.37432	**0.001**	***
	Residuals	24	0.22054	0.22381			
Order	Condition	4	2.3064	32.863	0.41312	**0.001**	***
	Time	4	1.9342	27.558	0.34644	**0.001**	***
	Condition:Time	10	0.9213	5.251	0.16501	**0.001**	***
	Residuals	24	0.4211	0.07543			
Family	Condition	4	2.3400	31.5473	0.40911	**0.001**	***
	Time	4	1.9645	26.4847	0.34346	**0.001**	***
	Condition:Time	10	0.9701	5.2318	0.16962	**0.001**	***
	Residuals	24	0.4450	0.07781			
Genus	Condition	4	2.3339	27.195	0.39814	**0.001**	***
	Time	4	2.0508	23.897	0.34984	**0.001**	***
	Condition:Time	10	0.9625	4.486	0.16419	**0.001**	***
	Residuals	24	0.5149	0.08784			

Pariwise PERMANOVA						
Sampling time		Ti	T0	T7	T14	T21
	T0	**0.0150**	-	-	-	-
	T7	**0.0187**	**0.0037**	-	-	-
	T14	**0.0187**	**0.0037**	0.1800	-	-
	T21	**0.0480**	**0.0037**	**0.0300**	0.3035	-
	TF	**0.0150**	**0.0037**	0.0873	0.7880	0.5186
Condition		41p	41p_CTRL	41p_Cu	41p_Pb	
	41p_CTRL	**0.0486**	-	-	-	
	41p_Cu	**0.0100**	**0.0067**	-	-	
	41p_Pb	**0.0067**	0.1833	**0.0067**	-	
	41p_Cu_Pb	0.1087	**0.0100**	0.2840	**0.0075**	

Table E- 5 SIMPER analysis of taxonomic groups (family level) driving Bray Curtis dissimilarity to rank the percent contribution of individual prokaryotic families between condition differences of the first mesocosm experiment with a 90% cutoff. The cut-off for low contribution was set at a cumulative contribution of 90%. P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Time	Family	Contribution (%)	Cumulative (%)	P	Signifiance
T0	**41p CTRL vs 41p Cu**				
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Halieaceae	1.9 ± 0.70	48	0.011	*
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	1.2 ± 0.54	66	0.033	*
	Alphaproteobacteria; Parvularculales; Parvularculaceae	0.44 ± 0.05	88	0.008	**
	41p CTRL vs 41p Pb				
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1	2.1 ± 1.6	34	0.021	*
	41p CTRL vs 41p Cu Pb				
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Cellvibrionaceae	0.65 ± 0.19	72	0.013	*
	41p Cu vs 41p Pb				
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	1.6 ± 0.74	29	0.026	*
	41p Cu vs 41p Cu Pb				
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Cellvibrionaceae	0.63 ± 0.19	80	0.037	*
	41p Pb vs 41p Cu Pb				
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Cellvibrionaceae	0.73 ± 0.27	48	0.002	**
T7	**41p CTRL vs 41p Cu**				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	8.7 ± 1.8	20	0.007	**
	41p CTRL vs 41p Pb				
	None	-	-	-	-
	41p CTRL vs 41p Cu Pb				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	20 ± 0.68	35	0.005	**
	41p Cu vs 41p Pb				
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae	12 ± 0.52	21	0.01	**
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	11 ± 0.63	40	0.007	**
	41p Cu vs 41p Cu Pb				
	Others	5.6 ± 1.5	65	0.038	*
	41p Pb vs 41p Cu Pb				
	Others	7.4	77	0.038	*
T14	**41p Cu vs 41p Pb**				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	8.4 ± 0.57	48	0.04	*
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Halieaceae	5.3 ± 1.8	58	0.024	*
	Others	4.7 ± 0.83	66	0.023	*
	41p Cu vs 41p Cu Pb				
	None	-	-	-	-
	41p Pb vs 41p Cu Pb				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	17 ± 3.4	29	0.004	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	9.9 ± 2.4	46	0.025	*

	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1	4.0 ± 0.59	73	0.019	*
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	3.7 ± 0.66	86	0.043	*
T21	**41p Cu vs 41p Pb**				
	None	-	-	-	-
	41p Cu vs 41p Cu Pb				
	None	-	-	-	-
	41p Pb vs 41p Cu Pb				
	None	-	-	-	-
TF	**41p CTRL vs 41p Cu**				
	Others	8.4 ± 0.93	33	0.001	***
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	7.9 ± 2.4	59	0.007	**
	41p CTRL vs 41p Pb				
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae	3.3 ± 1.2	45	0.032	*
	41p CTRL vs 41p Cu Pb				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	17 ± 4.1	25	0.006	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	9.0 ± 2.2	38	0.012	*
	Others	8.0 ± 0.98	63	0.008	**
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	7.9 ± 2.4	74	0.006	**
	41p Cu vs 41p Pb				
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	9.9 ± 0.64	35	0.008	**
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Halieaceae	4.8 ± 1.6	66	0.043	*
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae	3.8 ± 1.1	86	0.002	**
	41p Cu vs 41p Cu Pb				
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Halieaceae	5.8 ± 1.5	27	0.003	**
	41p Pb vs 41p Cu Pb				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	17 ± 4.0	27	0.011	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	10 ± 0.67	43	0.002	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	8.3 ± 2.2	55	0.026	*
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1	3.0 ± 0.76	83	0.023	*
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae	2.9 ± 1.4	88	0.038	*

Table E- 6 SIMPER analysis of taxonomic groups (genus level) driving Bray Curtis dissimilarity to rank the percent contribution of individual prokaryotic families between condition differences of the first mesocosm experiment with a 90% cutoff. The cut-off for low contribution was set at a cumulative contribution of 90%. P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Condition	Genus	Contribution (%)	Cumulative (%)	P	Signifiance
41p CTRL vs 41p Cu	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI; Synechococcus	7.9 ± 2.4	13	0.005	**
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Maricaulis	1.3 ± 0.6	77	0.013	*
	Gammaproteobacteria; Thiotrichales; CHAB XI 27; Other	1.2 ± 0.6	82	0.01	*
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hyphomonas	1.1 ± 0.1	85	0.041	*
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae; Other	0.9 ± 0.3	88	0.019	*
41p CTRL vs 41p Pb	Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae; Erythrobacter	1.2 ± 0.6	47	0.027	*
41p CTRL vs 41p Cu Pb	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hirschia	9.0 ± 1.3	13	0.008	**
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI; Synechococcus	7.9 ± 2.4	24	0.007	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; NS5 marine group	7.9 ± 2.0	35	0.011	*
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Other	6.2 ± 3.6	54	0.029	*
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1; Candidatus Pelagibacter	2.4 ± 1.6	72	0.048	*
	Gammaproteobacteria; Thiotrichales; CHAB XI 27; Other	1.4 ± 0.7	78	0.003	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae; Other	0.9 ± 0.3	89	0.017	*
41p Cu vs 41p Pb	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Litorimicrobium;	6.1 ± 0.6	32	0.009	**
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Halieaceae; OM60; NOR5 clade	4.8 ± 1.6	48	0.032	*
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae; Rhodobium	2.8 ± 2.7	59	0.036	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Salinihabitans	2.2 ± 0.3	67	0.033	*
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; Glaciecola	2.2 ± 0.2	70	0.008	**
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; Alteromonas	1.6 ± 1.1	79	0.045	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Other	1.6 ± 1.0	82	0.036	*
	Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Other	1.5 ± 0.2	84	0.031	*

	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hyphomonas	1.1 ± 0.1	86	0.028	*
	Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae; Erythrobacter	1.1 ± 0.2	87	0.034	*
41p Cu vs 41p Cu Pb	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Halieaceae; OM60; NOR5 clade	5.8 ± 1.5	23	0.001	**
41p Pb vs 41p Cu Pb	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hirschia	9.0 ± 0.6	13	0.009	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; NS5 marine group	7.2 ± 2.0	23	0.034	*
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Other	6.3 ± 3.7	43	0.023	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Litorimicrobium;	6.3 ± 0.7	52	0.001	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae; Rhodobium	2.9 ± 2.7	62	0.035	*
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1; Candidatus Pelagibacter	2.5 ± 0.7	65	0.047	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Salinihabitans	2.4 ± 0.2	69	0.022	*
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae; Glaciecola	2.3 ± 0.1	72	0.007	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Other	1.7 ± 1.0	78	0.027	*
	Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Other	1.5 ± 0.2	82	0.035	*
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 2; Other	1.2 ± 0.4	84	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Erythrobacteraceae; Erythrobacter	1.1 ± 0.3	87	0.034	*

Table E- 7 Global (A) and pairwise (B) permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) examining the effects of the factors "Condition" and "Time" on the prokaryotic communities of control and Cu-treated conditions from both mesocosm experiments. Key to abbreviations and column headings: D.f, degrees of freedom; MS, mean square; F, F ratio; R2, coefficient of determination; P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Taxonomic rank	Source of variation	D.f	MS	F	R^2	P	Signifiance
Phylum	Condition	8	0.92318	55.633	0.64619	**0.001**	***
	Time	4	0.06164	7.429	0.04315	**0.001**	***
	Condition:Time	18	0.32352	8.665	0.22645	**0.001**	***
	Residuals	58	0.12031	0.08421			
Class	Condition	8	1.32267	28.2278	0.47083	**0.001**	***
	Time	4	0.51087	21.8054	0.18185	**0.001**	***
	Condition:Time	18	0.63600	6.0325	0.22639	**0.001**	***
	Residuals	58	0.33971	0.12093			
Order	Condition	8	6.3430	62.430	0.59445	**0.001**	***
	Time	4	1.8251	35.926	0.17104	**0.001**	***
	Condition:Time	18	1.7656	7.723	0.16547	**0.001**	***
	Residuals	58	0.7366	0.06903			
Family	Condition	8	6.6634	63.910	0.58430	**0.001**	***
	Time	4	1.8100	34.719	0.15871	**0.001**	***
	Condition:Time	18	2.1748	9.271	0.19070	**0.001**	***
	Residuals	58	0.7559	0.06628			
Genus	Condition	8	8.9952	63.746	0.60001	**0.001**	***
	Time	4	2.2704	32.179	0.15144	**0.001**	***
	Condition:Time	18	2.7032	8.514	0.18031	**0.001**	***
	Residuals	58	1.0230	0.06824			

Pairwise PERMANOVA									
Sampling time		Ti	T0	T7	T14	T21			
	T0	0.0300	-	-	-	-			
	T7	0.0021	0.0210	-	-	-			
	T14	0.0021	0.0021	0.0612	-	-			
	T21	0.0021	0.0021	0.0037	0.3400	-			
	TF	0.0021	0.0021	0.0067	0.1812	0.3400			
Condition		41p	41p_CTRL	41p_Cu	LAZ	LAZ_CTRL	LAZ_Cu	6ext	6ext_CTRL
	41p_CTRL	0.1000	-	-	-	-	-	-	-
	41p_Cu	**0.0053**	**0.0018**	-	-	-	-	-	-
	LAZ	**0.0322**	**0.0089**	**0.0036**	-	-	-	-	-
	LAZ_CTRL	**0.0020**	**0.0003**	**0.0003**	**0.0020**	-	-	-	-
	LAZ_Cu	**0.0018**	**0.0003**	**0.0003**	**0.0020**	**0.0003**	-	-	-
	6ext	**0.0322**	**0.0076**	**0.0037**	0.1000	**0.0020**	**0.0025**	-	-
	6ext_CTRL	**0.0019**	**0.0003**	**0.0003**	**0.0020**	**0.0020**	**0.0003**	**0.0020**	-
	6ext_Cu	**0.0020**	**0.0003**	**0.0003**	**0.0020**	**0.0003**	**0.0003**	**0.0020**	0.0501

Table E- 8 SIMPER analysis of taxonomic groups (family level) driving Bray Curtis dissimilarity to rank the percent contribution of individual prokaryotic families between control and Cu-treated condition differences of both mesocosm experiment with a 90% cutoff. The cut-off for low contribution was set at a cumulative contribution of 90%. P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Time	Family	Contribution (%)	Cumulative (%)	P	Signifiance
Ti	**41p vs LAZ**				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	8.8 ± 2.0	25	0.002	**
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1	8.5 ± 2.8	50	0.017	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	6.1 ± 0.94	68	0.017	*
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 2	2.8 ± 0.49	76	0.01	*
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	1.3 ± 1.7	79	0.008	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae	0.79 ± 0.49	88	0.005	**
	41p vs 6ext				
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 1	9.6 ± 2.8	26	0.005	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	7.1 ± 0.64	45	0.004	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	6.7 ± 1.8	63	0.043	*
	Others	3.3 ± 1.5	72	0.014	*
	Alphaproteobacteria; SAR11 clade; Surface 2	2.8 ± 0.43	80	0.014	*
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	1.6 ± 0.57	84	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae	0.75 ± 0.84	90	0.022	*
	LAZ vs 6ext				
	None	-	-	-	-
T0	**41p CTRL vs 41p Cu**				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	1.2 ± 0.54	66	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Parvularculales; Parvularculaceae	0.44 ± 0.05	88	0.007	**
	LAZ CTRL vs LAZ Cu				
	None	-	-	-	-
	6ext CTRL vs 6ext Cu				
	None	-	-	-	-
T7	**41p CTRL vs 41p Cu**				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	8.7 ± 1.8	20	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	7.8 ± 3.5	37	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae	5.7 ± 1.1	50	0.001	**
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	4.7 ± 1.1	61	0.003	**
	LAZ CTRL vs LAZ Cu				
	Alphaproteobacteria; Rickettsiales; SAR116 clade	2.1 ± 0.39	75	0.003	**
	6ext CTRL vs 6ext Cu				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	6.8 ± 1.1	36	0.027	*
T14	**LAZ CTRL vs LAZ Cu**				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	15 ± 2.4	30	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae	5.3 ± 1.4	57	0.002	**

	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Cellvibrionaceae	1.6 ± 0.41	87	0.029	*
	Others	3.0 ± 1.7	80	0.047	*
	6ext CTRL vs 6ext Cu				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	12 ± 2.9	36	0.011	*
T21	**LAZ CTRL vs LAZ Cu**				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	15 ± 2.7	27	0.022	*
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae	13 ± 3.0	51	0.002	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae	8.1 ± 2.6	65	0.002	**
	6ext CTRL vs 6ext Cu				
	None	-	-	-	-
TF	**41p CTRL vs 41p Cu**				
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae	12 ± 2.3	19	0.026	*
	Others	8.4 ± 0.93	33	0.006	**
	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI	7.9 ± 2.4	59	0.009	**
	Alphaproteobacteria; Parvularculales; Parvularculaceae	7.5 ± 2.5	71	0.05	*
	LAZ CTRL vs LAZ Cu				
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae	7.0 ± 2.9	63	0.001	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae	2.6 ± 1.7	81	0.006	**
	Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae	2.3 ± 0.53	87	0.048	*
	6ext CTRL vs 6ext Cu				
	None	-	-	-	-

Table E- 9 SIMPER analysis of taxonomic groups (genus level) driving Bray Curtis dissimilarity to rank the percent contribution of individual prokaryotic families between control and Cu-treated condition differences of both mesocosm experiment with a 90% cutoff. The cut-off for low contribution was set at a cumulative contribution of 90%. P, p-value. Probabilities are marked as follows '***' p<0.001; '**' p<0.01; '*' p<0.05.

Condition	Genus	Contribution (%)	Cumulative (%)	P	Signifiance
41p CTRL vs 41p Cu	Cyanobacteria; SubsectionI; FamilyI; Synechococcus	7.9 ± 2.4	13	0.008	**
	Alphaproteobacteria; Parvularculales; Parvularculaceae; Parvularcula	7.5 ± 2.5	25	0.048	*
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; NS5 marine group	6.2 ± 2.0	46	0.008	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Litorimicrobium	5.0 ± 0.16	54	0.006	**
	Gammaproteobacteria; Thiotrichales; CHAB; XI; 27; Other	1.2 ± 0.61	82	0.012	*
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hyphomonas	1.1 ± 0.11	85	0.005	*
LAZ CTRL vs LAZ Cu	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Salinihabitans	12 ± 3.7	18	0.001	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Jannaschia	10 ± 1.3	32	0.003	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Cryomorphaceae; Other	7.1 ± 3.0	42	0.001	**
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Hirschia	7.0 ± 4.0	52	0.042	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Other	3.1 ± 0.97	63	0.003	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae; Rhodobium	2.6 ± 1.7	67	0.008	**
	OPB35 soil group; Other; Other; Other	1.2 ± 0.59	76	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Ascidiaceihabitans	1.0 ± 0.13	78	0.003	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Loktanella	0.67 ± 0.11	84	0.002	*
6ext CTRL vs 6ext Cu	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Ruegeria	3.5 ± 1.1	26	0.003	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Formosa	3.0 ± 0.82	32	0.005	**
	Alphaproteobacteria; Rhizobiales; OCS116 clade; Other	2.6 ± 0.90	41	0.005	**
	Betaproteobacteria; Methylophilales; Methylophilaceae; Methylotenera	2.5 ± 0.31	45	0.005	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Roseovarius	1.6 ± 0.64	59	0.047	*
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Tenacibaculum	1.2 ± 0.38	65	0.004	**
	JTB23; Other; Other; Other	1.0 ± 0.66	69	0.043	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Sulfitobacter 1	0.67 ± 0.09	75	0.005	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Polaribacter 4	0.57 ± 0.12	80	0.008	**
	Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Hyphomonadaceae; Ponticaulis	0.50 ± 0.27	81	0.01	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Thalassobius	0.49 ± 0.05	82	0.002	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Sulfitobacter	0.39 ± 0.04	83	0.005	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Oceanicola	0.39 ± 0.09	84	0.003	**
	Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Saprospiraceae; Other	0.38 ± 0.43	85	0.043	*
	Alphaproteobacteria; Other; Other; Other	0.36 ± 0.38	86	0.003	**
	Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; NS4 marine group	0.34 ± 0.19	87	0.005	**
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Pelagicola	0.33 ± 0.13	88	0.036	*
	Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; Marinovum	0.32 ± 0.09	88	0.002	**
	Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Spongiibacteraceae; Spongiibacter	0.29 ± 0.05	89	0.003	**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acosta-González, A., Rosselló-Móra, R., and Marqués, S. (2013) Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: Aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environ. Microbiol.* **15**: 77–92.

Aguinaga, O.E., McMahon, A., White, K.N., Dean, A.P., and Pittman, J.K. (2018) Microbial Community Shifts in Response to Acid Mine Drainage Pollution Within a Natural Wetland Ecosystem. *Front. Microbiol.* **9**: 1–14.

Ahner, B.A., Morel, F.M.M., and Moffett, J.W. (1996) Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnol. Ocean.* **42**: 601–608.

Ahner, B.A., Wei, L., Oleson, J.R., and Ogura, N. (2002) Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **232**: 93–103.

Albarracín, V.H., Alonso-Vega, P., Trujillo, M.E., Amoroso, M.J., and Abate, C.M. (2010) Amycolatopsis tucumanensis sp. nov., a copper-resistant actinobacterium isolated from polluted sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 397–401.

Allen, R.C., Tu, Y., Nevarez, M.J., Bobbs, A.S., Friesen, J.W., Lorsch, J.R., et al. (2013) The mercury resistance (mer) operon in a marine gliding flavobacterium, Tenacibaculum discolor 9A5. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83**: 135–148.

Allison, S.D. and Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 11512–11519.

Alonso-Sáez, L., Diaz-Pérez, L., and Morán, X.A.G. (2015) The hidden seasonality of the rare biosphere in coastal marine bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* **17**: 3766–3780.

Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E.R., Slikas, B., Boyd, G.D., Melvin, D.W., Morrall, C.E., et al. (2015) The biogeography of the Plastisphere: Implications for policy. *Front. Ecol. Environ.* **13**: 541–546.

Amo, M.A.K. and Agai, T.A.N. (2008) An application of the biotic ligand model to predict the toxicity effects of metal mixtures. *Environ. chemestry* **27**: 1479–1487.

Araújo, D.F., Boaventura, G.R., Machado, W., Viers, J., Weiss, D., Patchineelam, S.R., et al. (2016) Tracing of anthropogenic zinc sources in coastal environments using stable isotope composition. *Chem. Geol.* **449**: 226–235.

Ardestani, M.M., van Straalen, N.M., and van Gestel, C.A.M. (2014) The relationship between

metal toxicity and biotic ligand binding affinities in aquatic and soil organisms: a review. *Environ. Pollut.* **195**: 133–147.

Aßhauer, K.P., Wemheuer, B., Daniel, R., and Meinicke, P. (2015) Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* **31**: 2882–2884.

Atlas, R.M., Horowitz, A., Krichevsky, M., and Bej, A.K. (1991) Response of Microbial Populations to Environmental Disturbance. *Microb. Ecol.* **22**: 249–256.

Atlas, R.M., Stoeckel, D.M., Faith, S.A., Minard-Smith, A., Thorn, J.R., and Benotti, M.J. (2015) Oil Biodegradation and Oil-Degrading Microbial Populations in Marsh Sediments Impacted by Oil from the Deepwater Horizon Well Blowout. *Environ. Sci. Technol.* **49**: 8356–8366.

Ayata, S.D., Lévy, M., Aumont, O., Resplandy, L., Tagliabue, A., Sciandra, A., and Bernard, O. (2014) Phytoplankton plasticity drives large variability in carbon fixation efficiency. *Geophys. Res. Lett.* **41**: 8994–9000.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J., G ray, J., Meyer-Reil, L., and Thingstad, F. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257–263.

Azam, F. and Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 782–791.

Azarbad, H., Van Gestel, C.A.M., Niklińska, M., Laskowski, R., Rï¿½ling, W.F.M., and Van Straalen, N.M. (2016) Resilience of soil microbial communities to metals and additional stressors: DNA-based approaches for assessing “stress-on-stress” responses. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: 1–20.

Bachmann, J., Heimbach, T., Hassenrück, C., Kopprio, G.A., Iversen, M.H., Grossart, H.P., and Gärdes, A. (2018) Environmental Drivers of Free-Living vs. Particle-Attached Bacterial Community Composition in the Mauritania Upwelling System. *Front. Microbiol.* **9**: 1–13.

Baho, D.L., Peter, H., and Tranvik, L.J. (2012) Resistance and resilience of microbial communities - Temporal and spatial insurance against perturbations. *Environ. Microbiol.* **14**: 2283–2292.

Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., and McArthur, J. V. (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**: 176–182.

Baltar, F., Palovaara, J., Unrein, F., Catala, P., Horňák, K., Šimek, K., et al. (2015) Marine bacterial community structure resilience to changes in protist predation under phytoplankton bloom conditions. *ISME J.* **10**: 568.

Banks, S.C., Cary, G.J., Smith, A.L., Davies, I.D., Driscoll, D.A., Gill, A.M., et al. (2013) How does ecological disturbance influence genetic diversity? *Trends Ecol. Evol.* **28**: 670–679.

Bar-On, Y.M., Phillips, R., and Milo, R. (2018) The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: 6506–6511.

Barberán, A. and Casamayor, E.O. (2010) Global phylogenetic community structure and β-diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquat. Microb. Ecol.* **59**: 1–10.

Battin, T.J., Wille, A., Sattler, B., and Psenner, R. (2001) Phylogenetic and functional heterogeneity of sediment biofilms along environmental gradients in a glacial stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 799–807.

Beardall, J., Young, E., and Roberts, S. (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquat. Sci.* **63**: 44–69.

Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., et al. (2011) Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquat. Microb. Ecol.* **63**: 29–45.

Bellou, N., Papathanassiou, E., Dobretsov, S., Lykousis, V., and Colijn, F. (2012) The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the Eastern Mediterranean. *Biofouling* **28**: 199–213.

Berdjeb, L., Parada, A., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2018) Short-term dynamics and interactions of marine protist communities during the spring–summer transition. *ISME J.*

Berga, M., Székely, A.J., and Langenheder, S. (2012) Effects of disturbance intensity and frequency on bacterial community composition and function. *PLoS One* **7**: e36959.

Besaury, L., Ghiglione, J.F., and Quillet, L. (2014) Abundance, Activity, and Diversity of Archaeal and Bacterial Communities in Both Uncontaminated and Highly Copper-Contaminated Marine Sediments. *Mar. Biotechnol.* **16**: 230–242.

Beyenal, H. and Lewandowski, Z. (2004) Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water Res.* **38**: 2726–2736.

Beyenal, H., Sani, R.K., Peyton, B.M., Dohnalkova, A.C., Amonette, J.E., and Lewandowski, Z. (2004) Uranium Immobilization by Sulfate-Reducing Biofilms. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 2067–2074.

Bhurtun, P., Lesven, L., Ruckebusch, C., Halkett, C., Cornard, J.P., and Billon, G. (2019)

Understanding the impact of the changes in weather conditions on surface water quality. *Sci. Total Environ.* **652**: 289–299.

Bianchi, N. and Morri, C. (2000) Marine biodiversity of the Mediterranean Sea: situation, problems and prospects for future research. *Mar. Pollut. Bull.* **40**: 367–376.

Bianchi, T.S. (2007) Biogeochemistry of estuaries. Oxford Uni.

Biers, E.J., Sun, S., and Howard, E.C. (2009) Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: Interrogating the global ocean sampling metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2221–2229.

Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T.S., Doyle, P.S., and Ribbeck, K. (2015) Material properties of biofilms - A review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports Prog. Phys.* **78**: 36601.

Blanck, H. (2002) A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **8**: 1003–1034.

Blanck, H., Wangberg, S.A., and Molander, S. (1988) Pollution-Induced Community Tolerance - A new ecotoxicological tool . In, *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of chemicals.* Philadelphia, pp. 219–230.

Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., et al. (2008) Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, Mytilus galloprovincialis, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat. Toxicol.* **89**: 257–266.

Boge, G., Jean, N., Jamet, J., Jamet, D., and Richard, S. (2006) Seasonal changes in phosphatase activities in Toulon Bay (France). *Mar. Environ. Res.* **61**: 1–18.

Bogé, G., Lespilette, M., Jamet, D., and Jamet, J.L. (2012) Role of sea water DIP and DOP in controlling bulk alkaline phosphatase activity in N.W. Mediterranean Sea (Toulon, France). *Mar. Pollut. Bull.* **64**: 1989–1996.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., et al. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* **10**: 57.

Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2004) Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 16630–16635.

Bonato, S., Breton, E., Didry, M., Lizon, F., Cornille, V., Lécuyer, E., et al. (2016) Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore-offshore gradients using flow cytometry: A case study in the eastern English Channel. *J. Mar. Syst.* **156**: 76–85.

Bonato, S., Christaki, U., Lefebvre, A., Lizon, F., Thyssen, M., and Artigas, L.F. (2015) High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: The eastern English Channel. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **154**: 214–223.

Bonnet, S., Guieu, C., Chiaverini, J., Ras, J., and Stock, A. (2005) Effect of atmospheric nutrients on the autotrophic communities in a low nutrient, low chlorophyll system. *Limnol. Ocean.* **50**: 1810–1819.

Borrel, G., Lehours, A.-C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A., et al. (2012) Stratification of Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake : Vertical Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. *PLoS One* **7**: e43346.

Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A.M., Ehrlich, G.D., and Stewart, P.S. (2004) Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of Pseudomonas aeruginosa in Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2659–2664.

Bourrelier, P.H., Berthelin, J., and Pédro, G. (1998) Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. *Tec Doc.*

Bouvier, T.C. and del Giorgio, P. a (2002) Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Ocean.* **47**: 453–470.

Boyd, P.W., Strzepek, R., Fu, F., and Hutchins, D.A. (2010) Environmental control of open-ocean phytoplankton groups : Now and in the future. *Limnol. Oceanogr.* **55**: 1353–1376.

Boyd, T.J., Wolgast, D.M., Rivera-duarte, I., Holm-hansen, O., Hewes, C.D., Zirino, A., and Chadwick, D.B. (2005) Effects of Dissolved and Complexed Copper on Heterotrophic Bacterial Production in San Diego Bay. *Microb. Ecol.* **49**: 353–366.

Brand, E., Sunda, G., and Guillard, R.R.L. (1983) Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese, and iron. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 1182–1198.

Brand, L.E., Sunda, W.G., and Guillard, R.R.L. (1986) Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **96**: 225–250.

Briand, J.-F., Barani, A., Garnier, C., Réhel, K., Urvois, F., Lepoupon, C., et al. (2017) Spatio-Temporal Variations of Marine Biofilm Communities Colonizing Artificial Substrata

Including Antifouling Coatings in Contrasted French Coastal Environments. *Environ. Microbiol.* **74**: 585–598.

Briand, J.-F., Djeridi, I., Jamet, D., Coupé, S., Bressy, C., Molmeret, M., et al. (2012) Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* **28**: 453–63.

Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**: 198–207.

Bruland, K.W. and Lohan, M.C. (2006) Controls of trace metals in seawater. In, *The Oceans and Marine Geochemistry.*, pp. 23–47.

Bruland, K.W., Middag, R., and Lohan, M.C. (2013) Controls of Trace Metals in Seawater 2nd ed. Elsevier Ltd.

Brunet, C., Casotti, R., Vantrepotte, V., and Conversano, F. (2007) Vertical variability and diel dynamics of picophytoplankton in the Strait of Sicily, Mediterranean Sea, in summer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **346**: 15–26.

Brunet, C., Casotti, R., Vantrepotte, V., Corato, F., and Conversano, F. (2006) Picophytoplankton diversity and photoacclimation in the Strait of Sicily (Mediterranean Sea) in summer. I. Mesoscale variations. *Aquat. Microb. Ecol.* **44**: 127–141.

Bryant, J.A., Clemente, T.M., Viviani, D.A., Fong, A.A., Thomas, K.A., Kemp, P., et al. (2016) Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* **1**: e00024-16.

Buchan, A., LeCleir, G.R., Gulvik, C.A., and González, J.M. (2014) Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 686–698.

Buffle, J. and Chalmers, R.A. (1988) Complexation reactions in aquatic systems.

Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., and Sørensen, S.J. (2014) Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? *Trends Microbiol.* **22**: 84–91.

Burnat, M., Diestra, E., Esteve, I., and Sole, A. (2009) In situ determination of the fffects of lead and copper on cyanobacterial populations in microcosms. *PLoS One* **4**: e6204.

Cabrol, L., Quéméneur, M., and Misson, B. (2017) Inhibitory effects of sodium azide on microbial growth in experimental resuspension of marine sediment. *J. Microbiol. Methods* **133**: 62–65.

Caillat, A., Ciffroy, P., Grote, M., Rigaud, S., and Garnier, J.M. (2014) Bioavailability of copper

in contaminated sediments assessed by a DGT approach and the uptake of copper by the aquatic plant Myriophyllum aquaticum. *Environ. Toxicol. Chem.* **33**: 278–285.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., and Holmes, S.P. (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* **11**: 2639–2643.

Callahan, B.J., Mcmurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., and Holmes, S.P. (2016) DADA2 : High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**: 581.

Callender, E. (2003) Heavy Metals in the Environment – Historical Trends 2nd ed. Published by Elsevier Inc.

Campbell, A.M., Fleisher, J., Sinigalliano, C., White, J.R., and Lopez, J. V (2015) Dynamics of marine bacterial community diversity of the coastal waters of the reefs , inlets , and wastewater outfalls of southeast Florida. *Microbiology* **4**: 390–408.

Campbell, B.J. and Kirchman, D.L. (2012) Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME J.* **7**: 210.

Campbell, B.J., Yu, L., Heidelberg, J.F., and Kirchman, D.L. (2011) Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 12776–12781.

Camps, M., Barani, A., Gregori, G., Bouchez, A., le Berre, B., Bressy, C., et al. (2014) Antifouling coatings influence both abundance and community structure of colonizing biofilms: A case study in the Northwestern Mediterranean Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 4821–4831.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**: 335–336.

Caporaso, J.G., Paszkiewicz, K., Field, D., Knight, R., and Gilbert, J.A. (2011) The Western English Channel contains a persistent microbial seed bank. *ISME J.* **6**: 1089–1093.

Cappuyns, V. and Swennen, R. (2005) Kinetics of element release during combined oxidation and pHstat leaching of anoxic river sediments. *Appl. Geochemistry* **20**: 1169–1179.

Carlson, C.A., Morris, R., Parsons, R., Treusch, A.H., Giovannoni, S.J., and Vergin, K. (2009) Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *ISME J.* **3**: 283–295.

Carman, K.R., Fleeger, J.W., and Pomarico, S.M. (2000) Does historical exposure to hydrocarbon contamination alter the response of benthic communities to diesel

contamination ? *Mar. Environ. Res.* **49**: 255–278.

Caroppo, C., Stabili, L., Aresta, M., Corinaldesi, C., Danovaro, R., Ambiente, I., et al. (2006) Impact of Heavy Metals and PCBs on Marine Picoplankton. *Environ. Toxicol.* **21**: 541–551.

Casas, S., Gonzalez, J.-L., Andral, B., and Cossa, D. (2008) Relation between metal concentration in water and metal content of marine mussels (Mytilus galloprovincialis): impact of physiology. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**: 1543–1552.

Casotti, R., Landolfi, A., C., B., F., D., Mangoni, O., and Ribera d'Alcalà, M. (2003) Composition and dynamics of the phytoplankton of the Ionian Sea (eastern Mediterranean). *J. Geophys. Res. Ocean.* **108**: C9.

Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F. (2014) Responses to Oxidative and Heavy Metal Stresses in Cyanobacteria: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 871–886.

Castro-Bugallo, A., González-Fernández, Á., Guisande, C., and Barreiro, A. (2014) Comparative Responses to Metal Oxide Nanoparticles in Marine Phytoplankton. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **67**: 483–493.

Catão, E.C., Pollet, T., Misson, B., Garnier, C., Barry-martinet, R., Maintenay, M., and Bressy, C. Shear stress as a major driver of marine biofilm communities in the NW Mediterranean Sea. *Front. Microbiol.*

Cavet, J.S., Borrelly, G.P.M., and Robinson, N.J. (2003) Zn, Cu and Co in cyanobacteria: Selective control of metal availability. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 165–181.

Charpy, L. and Blanchot, J. (1998) Photosynthetic picoplankton in French Polynesian atoll lagoons : estimation of taxa contribution to biomass and production by flow cytometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **162**: 57–70.

Chen, C., Maki, J.S., Rittschof, D., and Teo, S.L. (2013) Early marine bacterial bio fi lm on a copper-based antifouling paint. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **83**: 71–76.

Chen, J., He, F., Zhang, X., Sun, X., Zheng, Jufeng, and Zheng, Jinwei (2014) Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **87**: 164–181.

Chen, L. xing, Li, J., Chen, Y., Huang, L., Hua, Z., Hu, M., and Shu, W. (2013) Shifts in microbial community composition and function in the acidification of a lead/zinc mine tailings. *Environ. Microbiol.* **15**: 2431–2444.

Chen, Z., Zhu, L., and Wilkinson, K.J. (2010) Validation of the Biotic Ligand Model in Metal Mixtures : Bioaccumulation of Lead and Copper. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 3580–3586.

Chiasson-gould, S.A., Blais, J.M., and Poulain, A.J. (2014) Dissolved Organic Matter Kinetically Controls Mercury Bioavailability to Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **48**: 3153–3161.

Chiu, J.M.Y., Thiyagarajan, V., Pechenik, J.A., Hung, O.S., and Qian, P.Y. (2007) Influence of bacteria and diatoms in biofilms on metamorphosis of the marine slipper limpet Crepidula onyx. *Mar. Biol.* **151**: 1417–1431.

Chow, C.T., Sachdeva, R., Cram, J.A., Steele, J.A., Needham, D.M., Patel, A., et al. (2013) Temporal variability and coherence of euphotic zone bacterial communities over a decade in the Southern California Bight. *ISME J.* **7**: 2259.

Chung, C.C., Gong, G.C., Huang, C.Y., Lin, J.Y., and Lin, Y.C. (2015) Changes in the Synechococcus Assemblage Composition at the Surface of the East China Sea Due to Flooding of the Changjiang River. *Microb. Ecol.* **70**: 677–688.

Chung, H.C., Lee, O.O., Huang, Y.-L., Mok, S.Y., Kolter, R., and Qian, P.-Y. (2010) Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete Hydroides elegans. *ISME J.* **4**: 817–828.

Cindrić, A.-M., Cukrov, N., Durrieu, G., Garnier, C., Pižeta, I., and Omanović, D. (2017) Evaluation of Discrete and Passive Sampling (Diffusive Gradients in Thin-films – DGT) Approach for the Assessment of Trace Metal Dynamics in Marine Waters – a Case Study in a Small Harbor. *Croat. Chem. Acta* **90**: 177–185.

Cindrić, A.-M., Garnier, C., Oursel, B., Pizeta, I., and Omanović, D. (2015) Evidencing the natural and anthropogenic processes controlling trace metals dynamic in a highly stratified estuary : The Krka River estuary. *Mar. Pollut. Bull.* **94**: 199–216.

Clarke, K.R. (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* **18**: 117–143.

Clements, W.H. and Rohr, J.R. (2009) Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**: 1789.

Cloern, J.E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar Ecol Prog Ser* **210**: 223–253.

Coclet, C., Garnier, C., D'onofrio, S., Durrieu, G., Le Poupon, C., Omanović, D., et al. Evidence for microbial biofilm community structuring by sediment closeness rather than multichemical contamination or bacterioplankton composition. *Environ. Microbiol.*

Coclet, C., Garnier, C., Delpy, F., Jamet, D., Durrieu, G., Le Poupon, C., et al. (2018) Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton

communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. *Prog. Oceanogr.* **163**: 196–213.

Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., Omanović, D., D'onofrio, S., Poupon, C. Le, et al. (2019) Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area. *Front. Microbiol.* **10**: 250.

Compte-port, S., Borrego, C.M., Moussard, H., Jeanbille, M., Restrepo-ortiz, X., Diego, A. De, et al. (2018) Metal contaminations impact archaeal community composition , abundance and function in remote alpine lakes. *Environ. Microbiol.* **20**: 422–2437.

Comte, J. and Del Giorgio, P.A. (2011) Composition Influences the Pathway but not the Outcome of the Metabolic Response of Bacterioplankton to Resource Shifts. *PLoS One* **6**: e25266.

Comte, J., Lindström, E.S., Eiler, A., and Langenheder, S. (2014) Can marine bacteria be recruited from freshwater sources and the air? *ISME J.* **8**: 2423–2430.

Connell, J.H. (1978) For a general review of x-ray lithography with con-ventional $ources see for example. *Science (80-.).* **199**: 1302–1310.

Corcoll, N., Österlund, T., Sinclair, L., Eiler, A., Kristiansson, E., Backhaus, T., and Eriksson, K.M. (2017) Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**: 1–24.

Corcoll, N., Yang, J., Backhaus, T., Zhang, X., Eriksson, K.M., Reuse, R., and Sciences, M. (2019) Copper affects composition and functions of microbial communities in marine biofilms at environmentally relevant concentrations. *Front. Microbiol.* **9**: 1–15.

Cossa, D., Buscail, R., Puig, P., Chiffoleau, J.F., Radakovitch, O., Jeanty, G., and Heussner, S. (2014) Origin and accumulation of trace elements in sediments of the northwestern Mediterranean margin. *Chem. Geol.* **380**: 61–73.

Cossa, Daniel, Garnier, C., Buscail, R., Elbaz-Poulichet, F., Mikac, N., Patel-Sorrentino, N., et al. (2014) A Michaelis-Menten type equation for describing methylmercury dependence on inorganic mercury in aquatic sediments. *Biogeochemistry* **119**: 35–43.

Costerton, J.W. (1995) Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* **15**: 137–140.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435–464.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.J. (1978) How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**: 86–95.

Cram, J.A., Chow, C.T., Sachdeva, R., Needham, D.M., Parada, A.E., Steele, J.A., and Fuhrman, J.A. (2015) Seasonal and interannual variability of the marine bacterioplankton community throughout the water column over ten years. *ISME J.* **9**: 563–580.

Crawford, D.W., Lipsen, M.S., Purdie, D.A., Lohan, M.C., Statham, P.J., Whitney, F.A., et al. (2003) Influence of zinc and iron enrichments on phytoplankton growth in the northeastern subarctic Pacific. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 1583–1600.

Crespo, B.G., Pommier, T., Fernández-Gómez, B., and Pedrós-Alió, C. (2013) Taxonomic composition of the particle-attached and free-living bacterial assemblages in the Northwest Mediterranean Sea analyzed by pyrosequencing of the 16S rRNA. *Microbiologyopen* **2**: 541–552.

Croot, P.L., Karlson, B., Wulff, a., Linares, F., and Andersson, K. (2002) Trace metal/phytoplankton interactions in the Skagerrak. *J. Mar. Syst.* **35**: 39–60.

Crump, B.C., Hopkinson, C.S., Sogin, M.L., Hobbie, J.E., Crump, B.C., Hopkinson, C.S., et al. (2004) Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Envioronmental Microbiol.* **70**: 1494–1505.

Dai, T., Zhang, Y., Ning, D., Su, Z., Tang, Y., Huang, B., et al. (2018) Dynamics of Sediment Microbial Functional Capacity and Community Interaction Networks in an Urbanized Coastal Estuary. *Front. Microbiol.* **9**:.

Dang, D.H. (2014) Dynamique sédimentaire et mécanismes de transferts des métaux / métalloïdes dans un écosystème contaminé : la Rade de Toulon.

Dang, D.H., Lenoble, V., Durrieu, G., Mullot, J.-U., Mounier, S., and Garnier, C. (2014) Sedimentary dynamics of coastal organic matter: An assessment of the porewater size/reactivity model by spectroscopic techniques. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **151**: 100–111.

Dang, D.H., Lenoble, V., Durrieu, G., Omanović, D., Mullot, J.-U., Mounier, S., and Garnier, C. (2015) Seasonal variations of coastal sedimentary trace metals cycling: Insight on the effect of manganese and iron (oxy)hydroxides, sulphide and organic matter. *Mar. Pollut. Bull.* **92**: 113–124.

Dang, D.H., Schäfer, J., Brach-Papa, C., Lenoble, V., Durrieu, G., Dutruch, L., et al. (2015) Evidencing the Impact of Coastal Contaminated Sediments on Mussels Through Pb Stable Isotopes Composition. *Environ. Sci. Technol.* **49**: 11438–11448.

Dang, D.H., Tessier, E., Lenoble, V., Durrieu, G., Omanović, D., Mullot, J.U., et al. (2014) Key parameters controlling arsenic dynamics in coastal sediments: An analytical and

modeling approach. *Mar. Chem.* **161**: 34–46.

Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. (2008) Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 52–60.

Dang, H. and Lovell, C.R. (2016) Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**: 91–138.

Dang, H. and Lovell, C.R. (2002a) Numerical dominance and phylotype diversity of marine Rhodobacter species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 496–504.

Dang, H. and Lovell, C.R. (2002b) Seasonal dynamics of particle-associated and free-living marine Proteobacteria in a salt marsh tidal creek as determined using fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* **4**: 287–295.

Das, P., Williams, C.J., Fulthorpe, R.R., Hoque, M.E., Metcalfe, C.D., and Xenopoulos, M.A. (2012) Changes in bacterial community structure after exposure to silver nanoparticles in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 9120–9128.

Dassenakis, M., Scoullos, M., and Gaitis, A. (1997) Trace metals transport and behaviour in the Mediterranean estuary of Acheloos River. *Mar. Pollut. Bull.* **34**: 103–111.

Davey, H.M. and Kell, D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* **60**: 641–696.

Davey, M. and O'toole, G. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. …* **64**: 847–867.

Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, T.A., and Lubian, L.M. (2009) Toxicity of copper in natural marine picoplankton populations. *Ecotoxicology* **18**: 1095–1103.

Debroas, D., Mone, A., and Ter, A. (2017) Plastics in the North Atlantic garbage patch : A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. *Sci. Total Environ.* **599–600**: 1222–1232.

Decho, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Cont. Shelf Res.* **20**: 1257–1273.

Degrune, F., Theodorakopoulos, N., Colinet, G., Hiel, M.P., Bodson, B., Taminiau, B., et al. (2017) Temporal dynamics of soil microbial communities below the seedbed under two contrasting tillage regimes. *Front. Microbiol.* **8**: 1127.

Delong, E.F. (1992) Archaea in coastal marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5685–

5689.

Delong, E.F., Delong, E.F., Preston, C.M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S.J., et al. (2006) Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. *Science (80-.).* **311**: 496–503.

Delpy, F., Serranito, B., Jamet, J., Grégori, G., Poupon, C. Le, and Jamet, D. (2018) Pico- and Nanophytoplankton Dynamics in Two Coupled but Contrasting Coastal Bays in the NW Mediterranean Sea (France). *Estuaries and Coasts* **41**: 2039–2055.

Dinsdale, E.A., Edwards, R.A., Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J.M., et al. (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nat. Lett.* **452**: 629.

Dobretsov, S. (2010) Marine biofilms. In, *Biofouling*., pp. 123–136.

Dobretsov, S., Abed, R.M.M., and Voolstra, C.R. (2013) The effect of surface colour on the formation of marine micro and macrofouling communities. *Biofouling* **29**: 617–27.

Dobretsov, S., Teplitski, M., and Paul, V. (2009) Mini-review : quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling . *Biofouling* **25**: 413–427.

Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Duffy, J.E., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., et al. (2012) Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **4**: 11–35.

Dufresne, C., Duffa, C., and Rey, V. (2014) Wind-forced circulation model and water exchanges through the channel in the Bay of Toulon. *Ocean Dyn.* **64**: 209–224.

Dunne, M.W.J. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 155–166.

Dussud, C., Meistertzheim, A.L., Conan, P., Pujo-Pay, M., George, M., Fabre, P., et al. (2018) Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environ. Pollut.* **236**: 807–816.

Echeveste, P., Agustí, S., and Tovar-Sánchez, A. (2012) Toxic thresholds of cadmium and lead to oceanic phytoplankton: Cell size and ocean basin-dependent effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**: 1887–1894.

Echeveste, P., Dachs, J., Berrojalbiz, N., and Agustí, S. (2010) Decrease in the abundance and viability of oceanic phytoplankton due to trace levels of complex mixtures of organic pollutants. *Chemosphere* **81**: 161–168.

Echeveste, P., Tovar-sanchez, A., and Agustí, S. (2014) Tolerance of polar phytoplankton communities to metals. *Environ. Pollut.* **185**: 188–195.

Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*

26: 2460–2461.

Edwards, S.J. and Kjellerup, B. V. (2013) Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 9909–9921.

Egardt, J., Mørk, M., Lassen, P., and Dahllöf, I. (2018) Release of PAHs and heavy metals in coastal environments linked to leisure boats. *Mar. Pollut. Bull.* **127**: 664–671.

Eggleton, J. and Thomas, K. V (2004) A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ. Int.* **30**: 973–980.

Eiler, A., Heinrich, F., and Bertilsson, S. (2011) Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa. *ISME J.* **6**: 330–342.

El-Swais, H., Dunn, K.A., Bielawski, J.P., Li, W.K.W., and Walsh, D.A. (2015) Seasonal assemblages and short-lived blooms in coastal north-west Atlantic Ocean bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* **17**: 3642–3661.

Elbaz-Poulichet, F. (2005) River Inputs of Metals and Arsenic. *Mediterr. Sea* **5**: 211–235.

Elbaz-Poulichet, F., Dezileau, L., Freydier, R., Cossa, D., and Sabatier, P. (2011) A 3500-year record of Hg and Pb contamination in a mediterranean sedimentary archive (The Pierre Blanche Lagoon, France). *Environ. Sci. Technol.* **45**: 8642–8647.

Elbaz-Poulichet, F., Holliger, P., Huang, W.W., and Martin, J.-M. (1984) Lead cycling in estuaries, illustrated by the Gironde estuary, France. *Nature* **308**: 409.

Elmqvist, T., Folke, C., Nyström, M., Peterson, G., Bengtsson, J., Walker, B., and Norberg, J. (2003) Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Front. Ecol. Environ.* **1**: 488–494.

Engh, G.J. Van Den, Doggett, J.K., Thompson, A.W., and Doblin, M.A. (2017) Dynamics of Prochlorococcus and Synechococcus at Station ALOHA Revealed through Flow Cytometry and High-Resolution Vertical Sampling. **4**: 1–14.

Estrada, M., Henriksen, P., Gasol, J.M., Casamayor, E.O., and Pedrós-Alió, C. (2004) Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**: 281–293.

Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., and Wood, W. (2007) Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **68**: 145–227.

Falkowski, P.G., Fenchel, T., and Delong, E.F. (2008) The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science (80-.).* **320**: 1034–1039.

Fang, H., Chen, Y., Huang, L., and He, G. (2017) Analysis of biofilm bacterial communities under different shear stresses using size-fractionated sediment. *Sci. Rep.* **7**: 1–13.

Fang, H.H.P., Xu, L.C., and Chan, K.Y. (2002) Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Res.* **36**: 4709–4716.

Faust, K. and Raes, J. (2016) CoNet app : inference of biological association networks using Cytoscape [version 2 ; referees : 2 approved]. *F1000Research* **5**: 1–14.

Faust, K., Sathirapongsasuti, J.F., Izard, J., Segata, N., Gevers, D., Raes, J., and Huttenhower, C. (2012) Microbial co-occurrence relationships in the Human Microbiome. *PLoS Comput. Biol.* **8**:.

Faÿ, F., Carteau, D., Linossier, I., and Vallée-Réhel, K. (2011) Evaluation of anti-microfouling activity of marine paints by microscopical techniques. *Prog. Org. Coatings* **72**: 579–585.

Fein, J.B. (2017) Advanced biotic ligand models: Using surface complexation modeling to quantify metal bioavailability to bacteria in geologic systems. *Chem. Geol.* **464**: 127–136.

Fenchel, T. (2008) The microbial loop - 25 years later. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **366**: 99–103.

Fenchel, T. and Finlay, B.J. (2004) The Ubiquity of Small Species : Patterns of Local and Global Diversity. *Bioscience* **54**: 777–784.

Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., and Falkowski, P. (1998) Primary Production of the Biosphere : Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science (80-.).* **281**: 237–240.

Field, K.G., Gordon, D., Wright, T., Rappé, M., Urbach, E., Vergin, K., and Giovannoni, S.J. (1997) Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 63–70.

Finkel, Z.V. (2001) Light absorption and size scaling of light-limited metabolism in marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 86–94.

Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–33.

Flemming, H.-C. and Wuertz, S. (2019) Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**: 247–260.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 563–575.

Flöder, S., Jaschinski, S., Wells, G., and Burns, C.W. (2010) Dominance and compensatory

growth in phytoplankton communities under salinity stress. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **395**: 223–231.

Flombaum, P., Gallegos, J.L., Gordillo, R.A., Rincón, J., Zabala, L.L., and Jiao, N. (2013) Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria Prochlorococcus and Synechococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 9824–9829.

Flores-rodriguez, J. (1992) Les métaux toxiques dans les eaux pluviales en milieu urbain: caractéristiques physico-chimiques.

Flynn, S.L., Szymanowski, J.E.S., and Fein, J.B. (2014) Modeling bacterial metal toxicity using a surface complexation approach. *Chem. Geol.* **374–375**: 110–116.

Fortunato, C.S., Herfort, L., Zuber, P., Baptista, A.M., and Crump, B.C. (2011) Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient. *ISME J.* **6**: 554–563.

Franklin, N.M., STauber, J.L., LIm, R.P., and Petocz, P. (2007) Toxicity of metal miture to a tropical freshwater alga (Chlorella Sp.): the Effect of Interactions Between Copper, Cadmium, and Zinc on Metal Cell Binding and Uptake. *Environ. Toxicol.* **21**: 2412–2422.

Fuhrman, J. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541.

Fuhrman, J.A. and Azam, F. (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 1085–1095.

Fuhrman, J.A., Cram, J.A., and Needham, D.M. (2015) Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *ISME J.* **13**: 133.

Fuhrman, J.A. and Davis, A.A. (1997) Widespread Archaea and novel Bacteria from the deep sea as shown by 16S rRNA gene sequences. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **150**: 275–285.

Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M. V, and Naeem, S. (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *PNAS* **103**: 13104–13109.

Fuhrman, J.A., Mccallum, K., and Davis, A.A. (1992) Novel major archaebacterial group from marine plankton. *Nature* **356**: 148.

Fuhrman, J.A. and Steele, J.A. (2008) Community structure of marine bacterioplankton : patterns , networks , and relationships to function. *Aquat. Microb. Ecol.* **53**: 69–81.

Fuhrman, J.A., Steele, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Brown, M. V, Green, J.L., and Brown,

J.H. (2008) A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 7774–7778.

Fuller, N.J., Marie, D., Vaulot, D., Post, A.F., and Scanlan, D.J. (2003) Clade-Specific 16S Ribosomal DNA Oligonucleotides Reveal the Predominance of a Single Marine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2430–2443.

Gadd, G.M. and Griffiths, A.J. (1977) Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* **4**: 303–317.

Galand, P.E., Gutiérrez-Provecho, C., Massana, R., Gasol, J.M., and Casamayor, E.O. (2010) Inter-annual recurrence of archaeal assemblages in the coastal NW Mediterranean Sea (Blanes Bay Microbial Observatory). *Limnol. Oceanogr.* **55**: 2117–2125.

Galand, P.E., Lucas, S., Fagervold, S.K., Pruski, A.M., Vétion, G., Dupuy, C., and Guizien, K. (2016) Disturbance Increases Microbial Community Diversity and Production in Marine Sediments. *Front. Microbiol.* **7**: 1–11.

Garcia-Pichel, F., Belnap, J., Neuer, S., and Schanz, F. (2003) Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* **109**: 213–227.

Garcia, M.D. and Bonel, N. (2014) Environmental modulation of the plankton community composition and size-structure along the eutrophic intertidal coast of the r??o de la plata estuary, Argentina. *J. Limnol.* **73**: 562–573.

Garczarek, L., Dufresne, A., Rousvoal, S., West, N.J., Mazard, S., Marie, D., et al. (2007) High vertical and low horizontal diversity of Prochlorococcus ecotypes in the Mediterranean Sea in summer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 189–206.

Garmendia, M., Revilla, M., and Bald, J. (2011) Phytoplankton communities and biomass size structure (fractionated chlorophyll '" a "'), along trophic gradients of the Basque coast (northern Spain). *Biogeochemestry* **106**: 243–263.

Garris, H.W., Baldwin, S.A., Taylor, J., Gurr, D.B., Denesiuk, D.R., Van Hamme, J.D., and Fraser, L.H. (2018) Short-term microbial effects of a large-scale mine-tailing storage facility collapse on the local natural environment. *PLoS One* **13**: e0196032.

Gasol, J.M., Giorgio, P. a D.E.L., and del Giorgio, P. a (2000) Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci. Mar.* **64**: 197–224.

Gee, A.K. and Bruland, K.W. (2002) Tracing Ni, Cu, and Zn kinetics and equilibrium partitioning between dissolved and particulate phases in South San Francisco Bay, California, using

stable isotopes and high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**: 3063–3083.

Genitsaris, S., Monchy, S., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Ferreira, S., and Christaki, U. (2015) Seasonal variations of marine protist community structure based on taxon-specific traits using the eastern English Channel as a model coastal system. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**: 1–45.

Geslin, C., Llanos, J., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2001) The manganese and iron superoxide dismutases protect Escherichia coli from heavy metal toxicity. *Res. Microbiol.* **152**: 901–905.

Ghiglione, J., Galand, P.E., Pommier, T., Pedrós-alió, C., and Maas, E.W. (2012) Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. **109**: 17633–17638.

Ghiglione, J.F., Conan, P., and Pujo-Pay, M. (2009) Diversity of total and active free-living vs. particle-attached bacteria in the euphotic zone of the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol. Lett.* **299**: 9–21.

Gifford, S.M., Sharma, S., Moran, M.A., Delmont, T.O., and Biological, M. (2014) Linking activity and function to ecosystem dynamics in a coastal bacterioplankton community. *Front. Microbiol.* **5**: 1–12.

Gilbert, J.A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., et al. (2009) The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environ. Microbiol.* **11**: 3132–3139.

Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbru, L., Reeder, J., Temperton, B., et al. (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* **6**: 298–308.

Gillan, D.C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., and Dubois, P. (2005) Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 679–690.

Gillan, D.C., Roosa, S., Kunath, B., Billon, G., and Wattiez, R. (2015) The long-term adaptation of bacterial communities in metal-contaminated sediments: A metaproteogenomic study. *Environ. Microbiol.* **17**: 1991–2005.

Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., and Field, K.G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60.

Giovannoni, S.J. and Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437**: 343–348.

Girault, M., Arakawa, H., Barani, a., Ceccaldi, H.J., Hashihama, F., and Gregori, G. (2015) Heterotrophic prokaryote distribution along a 2300 km transect in the North Pacific subtropical gyre during a strong La Niña conditions: relationship between distribution and hydrological conditions. *Biogeosciences* **12**: 3607–3621.

Godoy-Lozano, E.E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R.M., Juarez, K., et al. (2018) Bacterial Diversity and the Geochemical Landscape in the Southwestern Gulf of Mexico. *Front. Microbiol.* **9**: 1–15.

Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J., and The Galaxy Team (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* **11**: R86.

Goericke, R. (2002) Top-down control of phytoplankton biomass and community structure in the monsoonal Arabian Sea. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1307–1323.

Goes, J.I., Gomes, H. do R., Selph, K.E., and Landry, M.R. (2016) Biological response of Costa Rica Dome phytoplankton to Light, Silicic acid and Trace metals. *J. Plankton Res.* **38**: 290–304.

Goldberg, E.D. (1995) Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* **31**: 152–158.

Goni-Urriza, M., Moussard, H., Lafabrie, C., Carre, C., Bouvy, M., Sakka Hlaili, A., and Pringault, O. (2018) Consequences of contamination on the interactions between phytoplankton and bacterioplankton. *Chemosphere* **195**: 212–222.

Gonzalez-Davila, M. (1995) The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. *Mar. Chem.* **48**: 215–236.

Gough, H.L. and Stahl, D.A. (2011) Microbial community structures in anoxic freshwater lake sediment along a metal contamination gradient. *ISME J.* **5**: 543–558.

Grégori, G., Colosimo, A., and Denis, M. (2001) Phytoplankton group dynamics in the Bay of Marseilles during a 2-year survey based on analytical flow cytometry. *Cytometry* **44**: 247–256.

Griffiths, B.S. and Philippot, L. (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 112–129.

Grossart, H.P. (2010) Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: Changes in concepts are needed. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**: 706–714.

Grossart, H.P., Kiorboe, T., Tang, K.W., Allgaier, M., Yam, E.M., and Ploug, H. (2006)

Interactions between marine snow and heterotrophic bacteria: aggregate formation and microbial dynamics. *Aquat. Microb. Ecol.* **42**: 19–26.

Grumbein, S., Opitz, M., and Lieleg, O. (2014) Selected metal ions protect Bacillus subtilis biofilms from erosion. *Metallomics* **6**: 1441–1450.

Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **32**: 2847–2849.

Guigue, C., Tedetti, M., Dang, D.H., Mullot, J.U., Garnier, C., and Goutx, M. (2017) Remobilization of polycyclic aromatic hydrocarbons and organic matter in seawater during sediment resuspension experiments from a polluted coastal environment: Insights from Toulon Bay (France). *Environ. Pollut.* **229**: 627–638.

Gustavson, K., Petersen, S., Pedersen, B., Stuer-Lauridsen, F., Pedersen, S., and Wängberg, S.Å. (1999) Pollution-induced community tolerance (PICT) in coastal phytoplankton communities exposure to copper. *Hydrobiologia* **416**: 125–138.

Häder, D.-P. and Gao, K. (2015) Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. *Front. Environ. Sci.* **3**: 1–14.

Hagstrom, A., Larsson, U., Horstedt, P., and Normark, S. (1979) Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 805–812.

Hahn, M.W. and Ho, M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 113–121.

Halpern, S.B., Walbridge, S., Slekoe, A.K., Kappel, V.C., Micheli, F., D'Agrosa, C., et al. (2008) A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science (80-.).* **319**: 948–953.

Ham, K.D., Adams, S.M., and Peterson, M.J. (1997) Application of multiple bioindicators to differentiate spatial and temporal variability from the effects of contaminant exposure on fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **37**: 53–61.

Han, S., Zhang, Y., Masunaga, S., Zhou, S., and Naito, W. (2014) Relating metal bioavailability to risk assessment for aquatic species: Daliao River watershed, China. *Environ. Pollut.* **189**: 215–222.

Haras, D. (2005) Biofilms et altration des matriaux de l'analyse du phénomène aux stratgies de prévention. *Matériaux Tech.* **93**: 27–93.

Harmelin-Vivien, M., Cossa, D., Crochet, S., Bănaru, D., Letourneur, Y., and Mellon-Duval, C. (2009) Difference of mercury bioaccumulation in red mullets from the north-western

Mediterranean and Black seas. *Mar. Pollut. Bull.* **58**: 679–685.

Harrison, J., Ceri, H., Stremick, C., and Turner, R. (2004a) Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ. Microbiol.* **6**: 1220–1227.

Harrison, J., Ceri, H., Stremick, C., and Turner, R. (2004b) Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**: 357–362.

Harrison, J.J., Ceri, H., and Turner, R.J. (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 928–938.

Harrison, J.J., Rabiei, M., Turner, R.J., Badry, E.A., Sproule, K.M., and Ceri, H. (2006) Metal resistance in Candida biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**: 479–491.

Harrison, J.J., Tremaroli, V., Stan, M.A., Chan, C.S., Vacchi-Suzzi, C., Heyne, B.J., et al. (2009) Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol.* **11**: 2491–2509.

Harrison, J.J., Turner, R.J., and Ceri, H. (2005) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa. *Environ. Microbiol.* **7**: 981–994.

Hassett, D.J., Ma, J.F., Elkins, J.G., McDermott, T.R., Ochsner, U.A., West, S.E.H., et al. (1999) Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **34**: 1082–1093.

Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., et al. (2008) Eutrophication and harmful algal blooms : A scientific consensus. *Harmuf Algae* **8**: 3–13.

Hemme, C.L., Deng, Y., Gentry, T.J., Fields, M.W., Wu, L., Barua, S., et al. (2010) Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J.* **4**: 660–672.

Hobbie, J.E., Daley, R.J., and Jasper, S. (1977) Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria By Fluorescence Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225–1228.

Hollibaugh, J.T., Gifford, S., Sharma, S., Bano, N., and Moran, M.A. (2011) Metatranscriptomic analysis of ammonia-oxidizing organisms in an estuarine bacterioplankton assemblage. *ISME J.* **5**: 866–878.

Hugoni, M., Taib, N., Debroas, D., Domaizon, I., and Jouan, I. (2013) Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters.

Proc. Natl. Acad. Sci. **110**: 6004–6009.

van Hullebusch, E.D., Zandvoort, M.H., and Lens, P.N.L. (2003) Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**: 9–33.

Jean, N., Dumont, E., Durrieu, G., Balliau, T., Jamet, J.-L., Personnic, S., and Garnier, C. (2012) Protein expression from zooplankton communities in a metal contaminated NW mediterranean coastal ecosystem. *Mar. Environ. Res.* **80**: 12–26.

Jeanbille, M., Gury, J., Duran, R., Tronczynski, J., Ghiglione, J., Agogué, H., et al. (2016) Chronic Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Contamination Is a Marginal Driver for Community Diversity and Prokaryotic Predicted Functioning in Coastal Sediments. *Front. Microbiol.* **7**: 1–15.

Jeffries, T.C., Fontes, M.L.S., Harrison, D.P., Van-dongen-vogels, V., Eyre, B.D., Ralph, P.J., et al. (2016) Bacterioplankton Dynamics within a Large Anthropogenically Impacted Urban Estuary. *Front. Microbiol.* **6**: 1–17.

Le Jeune, A.H., Charpin, M., Deluchat, V., Briand, J.F., Lenain, J.F., Baudu, M., and Amblard, C. (2006) Effect of copper sulphate treatment on natural phytoplanktonic communities. *Aquat. Toxicol.* **80**: 267–280.

Jones, P.R., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., and Dexter, S.C. (2007) Bacterial Community Structure of Biofilms on Artificial Surfaces in an Estuary. *Microb. Ecol.* **53**: 153–162.

Jonsson, S., Andersson, A., Nilsson, M.B., Skyllberg, U., Lundberg, E., Schaefer, J.K., et al. (2017) Terrestrial discharges mediate trophic shifts and enhance methylmercury accumulation in estuarine biota. *Sci. Adv.* **3**: e1601239.

Jordi, A., Basterretxea, G., Tovar-Sánchez, A., Alastuey, A., and Querol, X. (2012) Copper aerosols inhibit phytoplankton growth in the Mediterranean Sea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 21246–9.

Kaci, A., Petit, F., Fournier, M., Cécillon, S., Boust, D., Lesueur, P., and Berthe, T. (2016) Diversity of active microbial communities subjected to long-term exposure to chemical contaminants along a 40-year-old sediment core. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 4095–4110.

Kalnejais, L.H., Martin, W.R., and Bothner, M.H. (2010) The release of dissolved nutrients and metals from coastal sediments due to resuspension. *Mar. Chem.* **121**: 224–235.

Kan, J., Suzuki, M.T., Wang, K., Evans, S.E., and Chen, F. (2007) High Temporal but Low Spatial Heterogeneity of Bacterioplankton in the Chesapeake Bay. *Appl. Envioronmental Microbiol.* **73**: 6776–6789.

Kang, S., Van Nostrand, J.D., Gough, H.L., He, Z., Hazen, T.C., Stahl, D.A., and Zhou, J. (2013) Functional gene array-based analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**: 200–214.

Karl, D.M. and Tien, G. (1992) MAGIC: A sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 105–116.

Kawakami, S.K., Gledhill, M., and Achterberg, E.P. (2006) Production of phytochelatins and glutathione by marine phytoplankton in response to metal stress. *J. Phycol.* **42**: 975–989.

Kennish, M.J. (2002) Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environ. Conserv.* **29**: 78–107.

Kent, A.D., Yannarell, A.C., Rusak, J.A., Triplett, E.W., and Mcmahon, K.D. (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *ISME J.* **1**: 38–47.

Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., and Lewis, K. (2004) Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia coli Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **186**: 8172–8180.

Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Frigerio, J.-M., Humbert, J.-F., and Bouchez, A. (2014) A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshw. Sci.* **33**: 349–363.

Kim, E.H., Mason, R.P., Porter, E.T., and Soulen, H.L. (2006) The impact of resuspension on sediment mercury dynamics, and methylmercury production and fate: A mesocosm study. *Mar. Chem.* **102**: 300–315.

Kim, M.S., Choi, M.S., and Kim, C. (2016) Monitoring Trace Metals in Seawater using a Diffusive Gradient in Thin Film Probe in Ulsan Bay , East Sea , Korea : Comparison with Transplanted Mussels. **51**: 169–182.

Kip, N. and Veen, J.A. Van (2015) The dual role of microbes in corrosion. *ISME J.* **9**: 542–551.

Kirchman, D.L., Morán, X.A.G., and Ducklow, H. (2009) Microbial growth in the polar oceans - Role of temperature and potential impact of climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 451–459.

Kirstein, I. V, Wichels, A., Krohne, G., and Gerdts, G. (2018) Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater - Specific or general? *Mar. Environ. Res.* **142**: 147–154.

Kooi, M., Van Nes, E.H., Scheffer, M., and Koelmans, A.A. (2017) Ups and Downs in the Ocean: Effects of Biofouling on Vertical Transport of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* **51**: 7963–7971.

Korlević, M., Zucko, J., Dragić, M.N., Blažina, M., Pustijanac, E., Zeljko, T.V., et al. (2015) Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**: 189–197.

Kou, S., Vincent, G., Gonzalez, E., Pitre, F.E., Labrecque, M., and Brereton, N.J.B. (2018) The response of a 16S ribosomal RNA gene fragment amplified community to lead, zinc, and copper pollution in a Shanghai field trial. *Front. Microbiol.* **9**: 1–23.

Krom, M.D., Emeis, K.-C., and Cappellen, P. Van (2010) Progress in Oceanography Why is the Eastern Mediterranean phosphorus limited ? *Prog. Oceanogr.* **85**: 236–244.

Lafabrie, C., Garrido, M., Leboulanger, C., Cecchi, P., Grégori, G., Pasqualini, V., and Pringault, O. (2013) Impact of contaminated-sediment resuspension on phytoplankton in the Biguglia lagoon (Corsica, Mediterranean sea). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **130**: 70–80.

Lambert, S., Tragin, M., Lozano, J.C., Ghiglione, J.F., Vaulot, D., Bouget, F.Y., and Galand, P.E. (2018) Rhythmicity of coastal marine picoeukaryotes, bacteria and archaea despite irregular environmental perturbations. *ISME J.* **13**: 388.

Lares, M.L., Marinone, S.G., Rivera-Duarte, I., Beck, A., and Sañudo-Wilhelmy, S. (2009) Spatial variability of trace metals and inorganic nutrients in surface waters of todos santos bay, méxico in the summer of 2005 during a red tide algal bloom. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **56**: 707–716.

Lau, S.C.K., Thiyagarajan, V., Cheung, S.C.K., and Qian, P.Y. (2005) Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquat. Microb. Ecol.* **38**: 41–51.

Laubier, L. (2005) Mediterranean Sea and Humans: Improving a Conflictual Partnership. In, *The Mediterranean Sea*., pp. 3–27.

Lawes, J.C., Neilan, B.A., Brown, M. V, Clark, G.F., and Emma, L. (2016) Elevated nutrients change bacterial community composition and connectivity : high throughput sequencing of young marine biofilms. *Biofouling* **32**: 57–69.

Layglon, N., Misson, B., Durrieu, G., Coclet, C., D'Onofrio, S., Francois, D., et al. (2019) Impact of sediment dredging on seawater quality: a long-term monitoring study of trace metals and microbial community in Toulon Bay (France). *Sci. Total Environ.*

Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008) FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* **25**: 1–18.

Lead, J.R., Davison, W., Hamilton-Taylor, J., and Buffle, J. (1997) Characterizing Colloidal

Material in Natural Waters. *Aquat. Geochemistry* **3**: 213–232.

Lebrun, E.S., King, R.S., Back, J.A., and Kang, S. (2017) Microbial Community Structure and Function Decoupling Across a Phosphorus Gradient in Streams. *Microb. Ecol.* **75**: 64–73.

Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., and Lee, D.-H. (2008) Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artivicial surfaces. *J. Microbiol.* **46**: 174–182.

Lee, O.O., Wang, Y., Tian, R., Zhang, W., Shek, C.S., Bougouffa, S., et al. (2014) In situ environment rather than substrate type dictates microbial community structure of biofilms in a cold seep system. *Sci. Rep.* **4**: 1–10.

Lee, S.W., Lee, C.W., Bong, C.W., Narayanan, K., and Sim, E.U.-H. (2015) The dynamics of attached and free-living bacterial population in tropical coastal waters. *Mar. Freshw. Res.* **66**: 701.

Leguay, S., Lavoie, I., Levy, J.L., and Fortin, C. (2016) Using biofilms for monitoring metal contamination in lotic ecosystems: The protective effects of hardness and pH on metal bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* **35**: 1489–1501.

Lejars, M., Margaillan, A., and Bressy, C. (2012) Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings. *Chem. Rev.* **112**: 4347–4390.

Lemire, J.A., Harrison, J.J., and Turner, R.J. (2013) Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 371–384.

Levin, L.A., Boesch, D.F., Covich, A., Dahm, C., Erséus, C., Ewel, K.C., et al. (2001) The function of marine critical transition zones and the importance of sediment biodiversity. *Ecosystems* **4**: 430–451.

Lewis, K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 48–56.

Li, W.K.W., Zohary, T., Yacobi, Y.Z., and Wood, A.M. (1993) Ultraphytoplankton in the eastern Mediterranean Sea: towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Ser. Mar. Ecol. Prog.* **102**: 79–87.

Li, W.K.W., Zohary, T., Yacobi, Y.Z., and Wood, A.M. (1984) Ultraphytoplankton in the eastern Mediterranean Sea: towards deriving phytoplankton biomass from flow cytometric measurements of abundance, fluorescence and light scatter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **102**: 79–87.

Lima-mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., et al. (2015)

Determinants of community structure in the global plankton interactome. **348**: 1–10.

Lindh, M. V, Sjöstedt, J., Casini, M., Andersson, A., Legrand, C., and Pinhassi, J. (2016) Local Environmental Conditions Shape Generalist But Not Specialist Components of Microbial Metacommunities in the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* **7**: 1–10.

Little, B.J. and Lee, J.S. (2014) Microbiologically influenced corrosion: an update. *Int. Mater. Rev.* **59**: 384–393.

Liu, H. and Fang, H.H.P. (2002) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol. Bioeng.* **80**: 806–811.

Liu, L., Yang, J., Lv, H., and Yu, Z. (2014) Synchronous dynamics and correlations between bacteria and phytoplankton in a subtropical drinking water reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**: 126–138.

Liu, R., Wang, L., Liu, Q., Wang, Z., Li, Z., Fang, J., et al. (2018) Depth-Resolved Distribution of Particle-Attached and Free-Living Bacterial Communities in the Water Column of the New Britain Trench. *Front. Microbiol.* **9**: 1–12.

Logares, R., Lindström, E.S., Langenheder, S., Logue, J.B., Paterson, H., Laybourn-Parry, J., et al. (2013) Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change. *ISME J.* **7**: 937–948.

López-García, P., López-López, A., Moreira, D., and Rodríguez-Valera, F. (2001) Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 193–202.

Lorenzo, J.I., Nieto, O., and Beiras, R. (2002) Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to Paracentrotus lividus larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* **58**: 27–41.

Louca, S., Wegener Parfrey, L., and Doebeli, M. (2011) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science (80-.).* **353**: 1272–1277.

Louis, Y., Garnier, C., Lenoble, V., Mounier, S., Cukrov, N., Omanovi, D., and Pizeta, I. (2009) Kinetic and equilibrium studies of copper-dissolved organic matter complexation in water column of the strati fi ed Krka River estuary (Croatia). *Mar. Chem.* **114**: 110–119.

Louis, Y., Garnier, C., Lenoble, V., Omanovic, D., Mounier, S., and Pizeta, I. (2009) Characterisation and modelling of marine dissolved organic matter interactions with major and trace cations. *Mar. Environ. Res.* **67**: 100–107.

Louriño-Cabana, B., Lesven, L., Charriau, A., Billon, G., Ouddane, B., and Boughriet, A. (2011)

Potential risks of metal toxicity in contaminated sediments of Deûle river in Northern France. *J. Hazard. Mater.* **186**: 2129–2137.

Lozupone, C.A. and Knight, R. (2007) Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 11436–11440.

Ludwig, W., Dumont, E., Meybeck, M., and Heussner, S. (2009) River discharges of water and nutrients to the Mediterranean and Black Sea: Major drivers for ecosystem changes during past and future decades? *Prog. Oceanogr.* **80**: 199–217.

Luria, C.M., Amaral-zettler, L.A., Ducklow, H.W., Repeta, D.J., Rhyne, A.L., Rich, J.J., and Rich, J.J. (2017) Seasonal Shifts in Bacterial Community Responses to Phytoplankton-Derived Dissolved Organic Matter in the Western Antarctic Peninsula Environmental Monitoring of Source. *Front. Microbiol.* **8**: 1–13.

Ma, Y., Liu, F., Kong, Z., Yin, J., Kou, W., Wu, L., and Ge, G. (2016) The distribution pattern of sediment archaea community of the poyang lake, the largest freshwater lake in China. *Archaea* **2016**: 12.

Ma, Z., Jacobsen, F.E., and Giedroc, D.P. (2009) Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. *Chem. Rev.* **109**: 4644–4681.

Macintyre, H.L., Lawrenz, E., and Richardson, T.L. (2010) Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. In, *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications.*, pp. 29–169.

Mackey, K.R.M., Buck, K.N., Casey, J.R., Cid, A., Lomas, M.W., Sohrin, Y., and Paytan, A. (2012) Phytoplankton responses to atmospheric metal deposition in the coastal and open-ocean Sargasso Sea. *Front. Microbiol.* **3**: 1–15.

Macleod, A.K., Stanley, M.S., Day, J.G., Cook, E.J., Macleod, A.K., Stanley, M.S., et al. (2016) Biofouling community composition across a range of environmental conditions and geographical locations suitable for floating marine renewable energy generation. *Biofouling* **32**: 261–276.

Magalhães, C.M., Machado, A., Matos, P., and Bordalo, A.A. (2011) Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**: 274–284.

Magazzù, G. and Decembrini, F. (1989) Primary production , biomass and abundance of phototrophic picoplankton in the Mediterranean Sea : a review. *Aquat. Microb. Ecol.* **9**: 97–104.

Mah, T.F. (2012) Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **7**: 1061–1072.

Mann, E.L., Ahlgren, N., Moffett, J.W., and Chisholm, S.W. (2002) Copper toxicity and cyanobacteria ecology in the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 976–988.

Marie, D., Rigaut-Jalabert, F., and Vaulot, D. (2014) An Improved Protocol for Flow Cytometry Analysis of Phytoplankton Cultures and Natural Samples. *Cytom. Part A* **85**: 962–968.

Martin-Platero, A.M., Cleary, B., Kauffman, K., Preheim, S.P., McGillicuddy, D.J., Alm, E.J., and Polz, M.F. (2018) High resolution time series reveals cohesive but short-lived communities in coastal plankton. *Nat. Commun.* **9**: 1–11.

Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., et al. (2006) Microbial biogeography : putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 102–112.

Massana, R., DeLong, E.F., and Pedros-Alio, C. (2000) A Few Cosmopolitan Phylotypes Dominate Planktonic Archaeal Assemblages in. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1777.

Mayer-Pinto, M., Underwood, A.J., Tolhurst, T., and Coleman, R.A. (2010) Effects of metals on aquatic assemblages: What do we really know? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **391**: 1–9.

Mazoyer, C. (2019) Modélisation des flux et du transport de polluants dans la rade de Toulon.

McDougald, D., Rice, S. a., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (2011) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 39–50.

McElroy, D.J., Doblin, M.A., Murphy, R.J., Hochuli, D.F., and Coleman, R.A. (2016) A limited legacy effect of copper in marine biofilms. *Mar. Pollut. Bull.* **109**: 117–127.

McGeer, J., Henningsen, G., Lanno, R., Fisher, N., Sappington, K., and Drexler, J. (2004) Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. In, *US Environmental Protection Agency risk assessment forum (Vol. 1200)*., p. 122.

McIntyre, A.D. (1995) Human impact on the oceans: The 1990s and beyond. *Mar. Pollut. Bull.* **31**: 147–151.

Mella-Flores, D., Mazard, S., Humily, F., Partensky, F., Mahé, F., Bariat, L., et al. (2011) Is the distribution of Prochlorococcus and Synechococcus ecotypes in the Mediterranean Sea affected by global warming ? *Biogeosciences* **8**: 2785–2804.

Mestre, M., Borrull, E., and Gasol, J.M. (2017) Patterns of bacterial diversity in the marine planktonic particulate matter continuum. *ISME J.* **11**: 999.

Meziti, A., Kormas, K.A., Moustaka-gouni, M., and Karayanni, H. (2015) Spatially uniform but

temporally variable bacterioplankton in a semi-enclosed coastal area. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**: 358–367.

Meziti, A., Tsementzi, D., Ar. Kormas, K., Karayanni, H., and Konstantinidis, K.T. (2016) Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. *Environ. Microbiol.* **18**: 4640–4652.

Miao, A.-J., Wang, W.-X., and Juneau, P. (2005) Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 2603–2611.

Miao, L., Wang, P., Hou, J., Yao, Y., Liu, Z., and Liu, S. (2019) Low concentrations of copper oxide nanoparticles alter microbial community structure and function of sediment biofilms. *Sci. Total Environ.* **653**: 705–713.

Micheli, F., Levin, N., Giakoumi, S., Katsanevakis, S., Abdulla, A., Coll, M., et al. (2013) Setting Priorities for Regional Conservation Planning in the Mediterranean Sea. *PLoS One* **8**: e59038.

Michotey, V., Guasco, S., Boeuf, D., Morezzi, N., Durieux, B., Charpy, L., and Bonin, P. (2012) Spatio-temporal diversity of free-living and particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters. *Mar. Pollut. Bull.* **65**: 525–537.

Middelboe, M.P. and Jörgensen, N.O.G. (2006) Viral lysis of bacteria : an important source of dissolved amino acids and cell wall compounds. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **86**: 605–612.

Migon, C. (2005) Trace Metals in the Mediterranean Sea. *Toxicol. Environ. Chem.* **5**: 151_176.

Migon, C., Sandroni, V., Marty, J.C., Gasser, B., and Miquel, J.C. (2002) Transfer of atmospheric matter through the euphotic layer in the northwestern Mediterranean: Seasonal pattern and driving forces. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **49**: 2125–2141.

Milan, M., Carraro, L., Fariselli, P., Martino, M.E., Cavalieri, D., Vitali, F., et al. (2018) Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. *Aquat. Toxicol.* **194**: 195–207.

Millot, C. (1990) The Gulf of Lions' hydrodynamics. *Cont. Shelf Res.* **10**: 885–894.

Misson, B., Garnier, C., Lauga, B., Dang, D.H., Ghiglione, J.F., Mullot, J.U., et al. (2016) Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay.

Sci. Total Environ. **556**: 319–329.

Misson, B., Mullot, J.-U., and Poulain, A.J. Marine sediment lyophilization does not impact microbial communaity structure assessed via amplico sequencing - Application tovertical environmental gradients within Toulon Bay (France). *In prep.*

Moffett, J.W., Brand, L.E., Croot, P.L., and Barbeau, K.A. (1997) Cu speciation and cyanobacterial distribution in harbors subject to anthropogenic Cu inputs. *Limnol. Oceanogr.* **42**: 789–799.

Monnin, L., Ciffroy, P., Garnier, J., Ambrosi, J., and Radakovitch, O. (2018) Kinetic processes of trace metals remobilization during resuspension of contaminated sediments from a dam reservoir. *J. Soils Sediments* **18**: 2596–2613.

Monroe, D. (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* **5**: e307.

Montoya, J.M., Pimm, S.L., and Solé, R. V. (2006) Ecological networks and their fragility. *Nature* **442**: 259–264.

Morán, X.A.G., Gasol, J.M., Pedrós-alió, C., and Estrada, M. (2002) Partitioning of phytoplanktonic organic carbon production and bacterial production along a coastal-offshore gradient in the NE Atlantic during different hydrographic regimes. *Aquat. Microb. Ecol.* **29**: 239–252.

Morley, N.H., Burton, J.D., Tankere, S.P.C., and Martin, J.-M. (1997) Distribution and behaviour of some dissolved trace metals in the western Mediterranean Sea. *Deep. Res. II* **44**: 675–691.

Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., and Giovannoni, S.J. (2002) SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* **420**: 803–806.

Mostajir, B., Amblard, C., Buffan-dubau, E., Wit, R. De, Lensi, R., Sime-ngando, T., et al. (2013) Les réseaux trophiques microbiens des milieux aquatiques et terrestres.

Moutin, T. and Raimbault, P. (2002) Primary production, carbon export and nutrients availability in western and eastern Mediterranean Sea in early summer 1996 (MINOS cruise). *J. Mar. Syst.* **33–34**: 273–288.

Mucha, A.P., Leal, M.F.C., Bordalo, A. a, and Vasconcelos, M.T.S.D. (2003) Comparison of the response of three microalgae species exposed to elutriates of estuarine sediments based on growth and chemical speciation. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 576–585.

Mugge, R.L., Brock, M.L., Salerno, J.L., Damour, M., Church, R.A., Lee, J.S., and Hamdan, L.J.

(2019) Deep-Sea Biofilms , Historic Shipwreck Preservation and the Deepwater Horizon Spill. *Front. Mar. Sci.* **6**:.

Mukherjee, A., Chett, B., Langpoklakpam, J.S., Basak, P., Mukherjee, A.K., Bhattacharyya, M., and Singh, A.K. (2017) Bioinformatic Approaches Including Predictive Metagenomic Profiling Reveal Characteristics of Bacterial Response to Petroleum Hydrocarbon Contamination in Diverse Environments. *Sci. Rep.* **7**: 1–22.

Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **27**: 31–36.

Myckatyn, T.M., Cohen, J., and Chole, R.A. (2016) Clarification of the definition of a "Biofilm." *Plast. Reconstr. Surg.* **137**: 237e-238e.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., and Kent, J. (2002) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–858.

Naik, M.M. and Dubey, S.K. (2013) Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **98**: 1–7.

Di Nanno, M.P., Curutchet, G., and Ratto, S. (2007) Anaerobic sediment potential acidification and metal release risk assessment by chemical characterization and batch resuspension experiments. *J. Soils Sediments* **7**: 187–194.

Navarro, E., Piccapietra, F., Piccapietra, F., Wagner, B., Wagner, B., Marconi, F., et al. (2008) Toxicity of Silver Nanoparticles to Chlamydomonas reinhardtii. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 8959–8964.

Nayar, S., Goh, B.P.L., and Chou, L.M. (2004) Environmental impact of heavy metals from dredged and resuspended sediments on phytoplankton and bacteria assessed in in situ mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **59**: 349–369.

Ndungu, K. (2012) Model predictions of copper speciation in coastal water compared to measurements by analytical voltammetry. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 7644–7652.

Nebe-Von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R., and Badley, R. a. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Methods* **42**: 97–114.

Needham, D.M. and Fuhrman, J.A. (2016) Pronounced daily succession of phytoplankton , archaea and bacteria following a spring bloom. *Nat. Microbiol.* **1**: 1–7.

Needham, D.M., Sachdeva, R., and Fuhrman, J.A. (2017) Ecological dynamics and co-occurrence among marine phytoplankton , bacteria and myoviruses shows microdiversity

matters. *ISME J.* **11**: 1614.

Nelson, C.E. and Wear, E.K. (2014) Microbial diversity and the lability of dissolved organic carbon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 7166–7167.

Neu, T.R. and Lawrence, J.R. (2015) Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol.* **23**: 233–242.

Ni, C., Horton, D.J., Rui, J., Henson, M.W., Jiang, Y., Huang, X., and Learman, D.R. (2016) High concentrations of bioavailable heavy metals impact freshwater sediment microbial communities. *Ann. Microbiol.* **66**: 1003–1012.

Nicolau, R. (2011) Caractérisation et quantification des transferts dus aux petites rivières côtières Méditerranéennes.

Nicolau, R., Lucas, Y., Merdy, P., and Raynaud, M. (2012) Base flow and stormwater net fluxes of carbon and trace metals to the Mediterranean sea by an urbanized small river. *Water Res.* **46**: 6625–6637.

Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730–750.

Nocker, A., Lepo, J.E., Martin, L.L., and Snyder, R.A. (2007) Response of estuarine biofilm microbial community development to changes in dissolved oxygen and nutrient concentrations. *Microb. Ecol.* **54**: 532–542.

Nogales, B., Lanfranconi, M.P., Pi, J.M., and Bosch, R. (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 275–298.

Nordberg, G.F., Fowler, B.A., and Nordberg, M. (2014) Handbook on the Toxicology of Metals. Academic p.

O'Sullivan, L.A., Sass, A.M., Webster, G., Fry, J.C., Parkes, R.J., and Weightman, A.J. (2013) Contrasting relationships between biogeochemistry and prokaryotic diversity depth profiles along an estuarine sediment gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 143–157.

Oberbeckmann, S., Kreikemeyer, B., Labrenz, M., and Harrison, J.P. (2018) Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Front. Microbiol.* **8**: 1–12.

Oberbeckmann, S., Löder, M.G.J., and Labrenz, M. (2015) Marine microplastic-associated biofilms - A review. *Environ. Chem.* **12**: 551–562.

Oberbeckmann, S., Loeder, M.G.J., Gerdts, G., and Osborn, A.M. (2014) Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **90**: 478–492.

Oberbeckmann, S., Osborn, A.M., and Duhaime, M.B. (2016) Microbes on a Bottle : Substrate , Season and Geography Influence Community Composition of Microbes Colonizing Marine Plastic Debris. *PLoS One* **11**: 1–24.

Oberholster, P.J., Myburgh, J.G., Ashton, P.J., and Botha, a. M. (2010) Responses of phytoplankton upon exposure to a mixture of acid mine drainage and high levels of nutrient pollution in Lake Loskop, South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**: 326–335.

Odum, E.P. (2013) Trends Expected in Stressed Ecosystems. **35**: 419–422.

Ogonowski, M., Motiei, A., Ininbergs, K., Hell, E., Gerdes, Z., Klas, I., et al. (2018) Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics. *Environ. Microbiol.* **20**: 2796–2808.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., and McGlinn, D. (2016) vegan: Community Ecology Package. Available online at: https:// CRAN.R-project.org/package=vegan.

Omanović, D. and Branica, M. (1998) Automation of Voltammetric Measurements by Polarographic Analyser PAR 384B *. *Croat. Chem. Acta* **71**: 421–433.

Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M.M., and Biosca, E.G. (2010) Exopolysaccharides favor the survival of Erwinia amylovora under copper stress through different strategies. *Res. Microbiol.* **161**: 549–555.

Ortega-Retuerta, E., Joux, F., Jeffrey, W.H., and Ghiglione, J.F. (2013) Spatial variability of particle-attached and free-living bacterial diversity in surface waters from the Mackenzie River to the Beaufort Sea (Canadian Arctic). *Biogeosciences* **10**: 2747–2759.

Ben Othman, H., Pringault, O., Louati, H., Sakka Hlaili, A., and Leboulanger, C. (2017) Impact of contaminated sediment elutriate on coastal phytoplankton community (Thau lagoon , Mediterranean Sea , France). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **486**: 1–12.

Oursel, B., Garnier, C., Durrieu, G., Mounier, S., Omanovic, D., and Lucas, Y. (2013) Dynamics and fates of trace metals chronically input in a Mediterranean coastal zone impacted by a large urban area. *Mar. Pollut. Bull.* **69**: 137–149.

Oursel, B., Garnier, C., Zebracki, M., Durrieu, G., Pairaud, I., Omanović, D., et al. (2014) Flood inputs in a mediterranean coastal zone impacted by a large urban area: Dynamic and fate of trace metals. *Mar. Chem.* **167**: 44–56.

Pace, N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science (80-.).* **276**: 734–740.

Paerl, H.W., Rossignol, K.L., Hall, S.N., Peierls, B.L., and Wetz, M.S. (2010) Phytoplankton community indicators of short- and long-term ecological change in the anthropogenically and climatically impacted neuse river estuary, North Carolina, USA. *Estuaries and Coasts* **33**: 485–497.

Painter, S.C., Henson, S.A., Forryan, A., Steigenberger, S., Klar, J., Stinchcombe, M.C., et al. (2014) An assessment of the vertical diffusive flux of iron and other nutrients to the surface waters of the subpolar North Atlantic Ocean. *Biogeosciences* **11**: 2113–2130.

Païssé, S., Ghiglione, J.F., Marty, F., Abbas, B., Gueuné, H., Amaya, J.M.S., et al. (2013) Sulfate-reducing bacteria inhabiting natural corrosion deposits from marine steel structures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 7493–7504.

Pandey, L.K., Han, T., and Gaur, J.P. (2015) Response of a phytoplanktonic assemblage to copper and zinc enrichment in microcosm. *Ecotoxicology* **24**: 573–582.

Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., et al. (2002) The biotic ligand model : a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **133**: 3–35.

Parada, A.E. and Fuhrman, J.A. (2017) Marine archaeal dynamics and interactions with the microbial community over 5 years from surface to seafloor. *ISME J.* **11**: 2510.

Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2016) Every base matters : assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities , time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* **18**: 1403–1414.

Partensky, F., Blanchot, J., Lantoine, F., Neveux, J., and Marie, D. (1996) Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deap-Sea Res.* **43**: 1191–1213.

Partensky, F., Hess, W.R., and Vaulot, D. (1999) Prochlorococcus, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 106–127.

Payne, C.D. and Price, N.M. (1999) Effects of Cadmium Toxicity on Growth and Elemental Composition of Marine Phytoplankton. *J. Phycol.* **35**: 293–302.

Pedler, B.E., Aluwihare, L.I., and Azam, F. (2014) Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 16–20.

Picket, S.T. and White, P.S. (1985) The ecology of natural disturbance and patch dynamics. *Orlando Acad.*

Pimm, L.S. (1984) Pimm 1984 nature Stability. *Nature* **307**: 321–326.

Pineda, M.C., Strehlow, B., Sternel, M., Duckworth, A., Haan, J. Den, Jones, R., and Webster,

N.S. (2017) Effects of sediment smothering on the sponge holobiont with implications for dredging management. *Sci. Rep.* **7**: 1–15.

Pinhassi, J., Sala, M.M., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., and Marrasé, C. (2004) Changes in bacterioplankton composition under different phytoplankton regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6753–6766.

Pinot, J.-M. and Ganachaud, A. (1999) The role of winter intermediate waters in the spring-summer circulation of the Balearic Sea 1. Hydrography and inverse box modeling. *J. Geophys. Res.* **104**: 29843–29864.

Platt, T., Rao, D.V.S., and Irwin, B. (1983) Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. *Nature* **301**: 702–704.

Pochon, X., Zaiko, A., Hopkins, G. a., Banks, J.C., and Wood, S. a. (2015) Early detection of eukaryotic communities from marine biofilm using high-throughput sequencing: an assessment of different sampling devices. *Biofouling* **31**: 241–251.

Pollet, T., Berdjeb, L., Garnier, C., Durrieu, G., Le Poupon, C., Misson, B., and Jean-François (2018) Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of Flavobacteriia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**: fiy083.

Pomeroy, L.R. (1974) The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *Bioscience* **24**: 499–504.

Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K.H., Simu, K., Lundberg, P., et al. (2007) Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol. Ecol.* **16**: 867–880.

Pothier, M.P., Hinz, A.J., and Poulain, A.J. (2018) Insights into arsenite and arsenate uptake pathways using a whole cell biosensor. *Front. Microbiol.* **9**: 1–11.

Pougnet, F., Schäfer, J., Dutruch, L., Garnier, C., Tessier, E., Dang, D.H., et al. (2014) Sources and historical record of tin and butyl-tin species in a Mediterranean bay (Toulon Bay, France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**: 6640–6651.

Le Poupon, C. (1994) Automatisation d'un procédé d'analyse de l'azote organique dissous après miné- ralisation en conditions réductrices.

Pringault, O., Lafabrie, C., Avezac, M., Bancon-Montigny, C., Carre, C., Chalghaf, M., et al. (2016) Consequences of contaminant mixture on the dynamics and functional diversity of bacterioplankton in a southwestern Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* **144**: 1060–1073.

Pringault, O., Viret, H., and Duran, R. (2012) Interactions between Zn and bacteria in marine

tropical coastal sediments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**: 879–92.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007) SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35**: 7188–7196.

Qian, J., Ding, Q., Guo, A., Zhang, D., and Wang, K. (2017) Alteration in successional trajectories of bacterioplankton communities in response to co-exposure of cadmium and phenanthrene in coastal water microcosms. *Environ. Pollut.* **221**: 480–490.

Qian, P.Y., Thiyagarajan, V., Lau, S.C.K., and Cheung, S.C.K. (2003) Relationship between bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle Balanus amphitrite. *Aquat. Microb. Ecol.* **33**: 225–237.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**: 590–596.

Quero, G.M., Cassin, D., Botter, M., Perini, L., and Luna, G.M. (2015) Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Front. Microbiol.* **6**: 1–15.

Quigg, A., Reinfelder, J.R., and Fisher, N.S. (2006) Copper uptake kinetics in diverse marine phytoplankton. *Sect. Title Water* **51**: 893–899.

R Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Radakovitch, O., Roussiez, V., Ollivier, P., Ludwig, W., Grenz, C., and Probst, J.L. (2008) Input of particulate heavy metals from rivers and associated sedimentary deposits on the Gulf of Lion continental shelf. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **77**: 285–295.

Rappé, M.S., Vergin, K., and Giovannoni, S.J. (2000) Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**: 219–232.

Rascio, V.J.D. (2000) Antifouling coatings: where do we go from here. *Corros. Rev.* **18**: 133–154.

Raven, J.A. (1984) A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytol.* **98**: 593–625.

Redfield, A.C. (1963) The influence of organisms on the composition of sea-water. *sea* **2**: 26–77.

Reynolds, C.S. (1984) The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge.

Riemann, L. and Middelboe, M. (2002) Viral lysis of marine bacterioplankton: Implications for organic matter cycling and bacterial clonal composition. *Ophelia* **56**: 57–68.

Rigaud, S., Radakovitch, O., Couture, R.M., Deflandre, B., Cossa, D., Garnier, C., and Garnier, J.M. (2013) Mobility and fluxes of trace elements and nutrients at the sediment-water interface of a lagoon under contrasting water column oxygenation conditions. *Appl. Geochemistry* **31**: 35–51.

Rimet, F. and Bouchez, A. (2011) Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. *Ecol. Indic.* **11**: 489–499.

Rimmelin, P. and Moutin, T. (2005) Re-examination of the MAGIC method to determine low orthophosphate concentration in seawater. *Anal. Chim. Acta* **548**: 174–182.

Robinson, C. (2008) Heterotrophic bacterial respiration. In, *Microbial Ecology of the Oceans.*, pp. 299–334.

Rochelle-Newall, E.J., Delesalle, B., Mari, X., Rouchon, C., Torréton, J.P., and Pringault, O. (2008) Zinc induces shifts in microbial carbon flux in tropical coastal environments. *Aquat. Microb. Ecol.* **52**: 57–68.

Rodríguez, J., Gallampois, C.M.J., Timonen, S., Andersson, A., Sinkko, H., Haglund, P., et al. (2018) Effects of Organic Pollutants on Bacterial Communities Under Future Climate Change Scenarios. *Front. Microbiol.* **9**: 1–21.

Rossi, N. and Jamet, J. (2008) In situ heavy metals (copper, lead and cadmium) in different plankton compartments and suspended particulate matter in two coupled Mediterranean coastal ecosystems (Toulon Bay, France). *Mar. Pollut. Bull.* **56**: 1862–1870.

Rouco, M., López-Rodas, V., González, R., Emma Huertas, I., García-Sánchez, M.J., Flores-Moya, A., and Costas, E. (2014) The limit of the genetic adaptation to copper in freshwater phytoplankton. *Oecologia* **175**: 1179–1188.

Ruyters, S., Mertens, J., Springael, D., and Smolders, E. (2010) Stimulated activity of the soil nitrifying community accelerates community adaptation to Zn stress. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 766–772.

Saito, M.A., Sigman, D.M., and Morel, F.M.M. (2003) The bioinorganic chemistry of the ancient ocean: The co-evolution of cyanobacterial metal requirements and biogeochemical cycles at the Archean-Proterozoic boundary? *Inorganica Chim. Acta* **356**: 308–318.

Salazar, G. and Sunagawa, S. (2017) Marine microbial diversity. *Curr. Biol.* **27**: R489–R494.

Salem, Z. Ben, Drira, Z., and Ayadi, H. (2015) What factors drive the variations of phytoplankton, ciliate and mesozooplankton communities in the polluted southern coast of Sfax, Tunisia? *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 11764–11780.

Salerno, J.L., Little, B., Lee, J., and Hamdan, L.J. (2018) Exposure to Crude Oil and Chemical Dispersant May Impact Marine Microbial Biofilm Composition and Steel Corrosion. *Front. Mar. Sci.* **5**: 1–14.

Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., and Briand, J.-F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **15**: 2879–2893.

Šantic, D., Krstulovic, N., Šolic, M., Kuspilic, G., Šantić, D., Krstulović, N., et al. (2012) HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria. *Acta Adriat.* **53**: 25–40.

Santoro, A.E., Richter, R.A., and Dupont, C.L. (2018) Planktonic Marine Archaea. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **11**: 131–158.

Sanudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1996) Trace metal concentrations in the surf zone and in coastal waters off Baja California, Mexico. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1575–1580.

Saulnier, I. and Mucci, A. (2000) Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Appl. Geochemistry* **15**: 191–210.

Sauret, C., Tedetti, M., Guigue, C., Dumas, C., Lami, R., Pujo-Pay, M., et al. (2015) Influence of PAHs among other coastal environmental variables on total and PAH-degrading bacterial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**: 4242–4256.

Scanlan, D.J. (2003) Physiological Diversity and Niche Adaptation Marine Synechococcus.

Scanlan, D.J. and West, N.J. (2002) Molecular ecology of the marine cyanobacteria genera Prochlorococcus and Synechococcus. *FEMS Microbiol. Ecol.* **40**: 1–12.

Schallenberg, M. and Burns, C.W. (2004) Effects of sediment resuspension on phytoplankton production: teasing apart the influences of light, nutrients and algal entrainment. *Freshw. Biol.* **49**: 143–159.

Schapira, M., Buscot, M.-J., Pollet, T., Leterme, S.C., and Seuront, L. (2010) Distribution of picophytoplankton communities from brackish to hypersaline waters in a South Australian coastal lagoon. *Saline Systems* **6**: 2.

von Scheibner, M., Sommer, U., and Jürgens, K. (2017) Tight Coupling of Glaciecola spp . and Diatoms during Cold-Water Phytoplankton Spring Blooms. *Front. Microbiol.* **8**: 1–11.

Schiff, K., Brown, J., Diehl, D., and Greenstein, D. (2007) Extent and magnitude of copper

contamination in marinas of the San Diego region, California, USA. *Mar. Pollut. Bull.* **54**: 322–328.

Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., and Hertel, W.M. (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**: 87–98.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., and Huttenhower, C. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**: R60.

Semeniuk, D.M., Bundy, R.M., Payne, C.D., Barbeau, K.A., and Maldonado, M.T. (2015) Acquisition of organically complexed copper by marine phytoplankton and bacteria in the northeast subarctic Pacific Ocean. *Mar. Chem.* **173**: 222–233.

Semeniuk, D.M., Bundy, R.M., Posacka, A.M., Robert, M., Barbeau, K.A., and Maldonado, M.T. (2016) Using 67 Cu to Study the Biogeochemical Cycling of Copper in the Northeast Subarctic Pacific. *Front. Microbiol.* **3**: 1–19.

Serra, a., Corcoll, N., and Guasch, H. (2009) Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: The influence of exposure history. *Chemosphere* **74**: 633–641.

Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Bürgmann, H., et al. (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* **3**: 1–19.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., et al. (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**: 2498–2504.

Sheeba, V.A., Abdulaziz, A., Gireeshkumar, T.R., Ram, A., Rakesh, P.S., Jasmin, C., and Parameswaran, P.S. (2017) Role of heavy metals in structuring the microbial community associated with particulate matter in a tropical estuary. *Environ. Pollut.* **231**: 589–600.

Shi, J., Li, G., and Wang, P. (2011) Anthropogenic Influences on the Tidal Prism and Water Exchanges in Jiaozhou Bay , Qingdao , China. *J. Coast. Res.* **27**: 57–72.

Shikuma, N.J. and Hadfield, M.G. (2010) Marine bioflims on submerged surfaces are a reservoir for Escherichia coli and Vibrio cholerae. *Biofouling* **26**: 39–46.

Sieburth, J., Smetacek, V., and Lenz, J. (1978) Pelagic ecosystem structure : Heterotrophic. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 1256–1263.

Sieradzki, E.T., Fuhrman, J.A., Rivero-Calle, S., and Gómez-Consarnau, L. (2018) Proteorhodopsins dominate the expression of phototrophic mechanisms in seasonal and dynamic marine picoplankton communities. *PeerJ* **6**: e5798.

Silver, S. (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene* **179**: 9–19.

Silver, S. and Phung, L.T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753–789.

Simon, M., Grossart, H., Schweitzer, B., and Ploug, H. (2002) Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 175–211.

Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M.G., Montresor, M., Ribera D'Alcala, M., Vaque, D., and Zingone, a. (2010) Plankton in the open mediterranean Sea: A review. *Biogeosciences* **7**: 1543–1586.

Sipler, R.E., Kellogg, C.T.E., Connelly, T.L., Roberts, Q.N., Yager, P.L., and Bronk, D.A. (2017) Microbial Community Response to Terrestrially Derived Dissolved Organic Matter in the Coastal Arctic. *Front. Microbiol.* **8**: 1–19.

Sjöstedt, J., Koch-Schmidt, P., Pontarp, M., Canbäck, B., Tunlid, A., Lundberg, P., et al. (2012) Recruitment of Members from the Rare Biosphere of Marine Bacterioplankton Communities after an Environmental Disturbance. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 1361–1369.

Sjöstedt, J., Langenheder, S., Kritzberg, E., Karlsson, C.M., and Lindström, E.S. (2018) Repeated disturbances affect functional but not compositional resistance and resilience in an aquatic bacterioplankton community. *Environ. Microbiol. Rep.* **10**: 493–500.

Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.L., and Ideker, T. (2011) Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* **27**: 431–432.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored '"rare biosphere."' *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 12115–12120.

Sohm, J. a, Ahlgren, N. a, Thomson, Z.J., Williams, C., Moffett, J.W., Saito, M. a, et al. (2015) Co-occurring Synechococcus ecotypes occupy four major oceanic regimes defined by temperature, macronutrients and iron. *ISME J.* **10**: 1–13.

Sohrin, Y. and Bruland, K.W. (2011) Global status of trace elements in the ocean. *Trends Anal. Chem.* **30**: 1291–1307.

Soldo, D., Hari, R., Sigg, L., and Behra, R. (2005) Tolerance of Oocystis nephrocytioides to copper: Intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquat. Toxicol.* **71**: 307–317.

de Souza Machado, A.A., Spencer, K., Kloas, W., Toffolon, M., Zarfl, C., Magnin, T., et al. (2016)

Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity. *Sci. Total Environ.* **541**: 268–281.

Spoering, A.L. and Lewis, K. (2001) Biofilms and Planktonic Cells of Pseudomonas aeruginosa Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**: 6746–6751.

Spring, S., Scheuner, C., Göker, M., and Klenk, H. (2015) A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. **6**: 1–17.

Steele, J.A., Countway, P.D., Xia, L., Vigil, P.D., Beman, J.M., Kim, D.Y., et al. (2011) Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *ISME J.* **5**: 1414–1425.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187–209.

Störmer, R., Wichels, A., and Gerdts, G. (2013) Geo-Chip analysis reveals reduced functional diversity of the bacterial community at a dumping site for dredged Elbe sediment. *Mar. Pollut. Bull.* **77**: 113–122.

Stouffer, D.B. and Bascompte, J. (2011) Compartmentalization increases food-web persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 3648–3652.

Stuart, R.K., Dupont, C.L., Johnson, D.A., Paulsen, I.T., and Palenik, B. (2009) Coastal Strains of Marine Synechococcus Species Exhibit Increased Tolerance to Copper Shock and a Distinctive Transcriptional Response Relative to Those of Open-Ocean Strains. *Appl. Envioronmental Microbiol.* **75**: 5047–5057.

Suffridge, C.P., Gómez-Consarnau, L., Monteverde, D.R., Cutter, L., Arístegui, J., Alvarez-Salgado, X.A., et al. (2018) B Vitamins and Their Congeners as Potential Drivers of Microbial Community Composition in an Oligotrophic Marine Ecosystem. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **123**: 2890–2907.

Sun, M.Y., Dafforn, K.A., Brown, M. V, and Johnston, E.L. (2012) Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Mar. Pollut. Bull.* **64**: 1029–1038.

Sun, M.Y., Dafforn, K.A., Johnston, E.L., and Brown, M. V (2013) Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environ. Microbiol.* **15**: 2517–2531.

Sunagawa, S., Coelho, L.P., Chaffron, S., Kultima, J.R., Labadie, K., Salazar, G., et al. (2015) Structure and function of the global ocean microbiome. *Science (80-.).* **348**: 1–10.

Sunda, W.G. (2012) Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front. Microbiol.* **3**: 1–22.

Sunda, W.G. and Huntsman, S.A. (1995) Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton : Biological and geochemical implications. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1404–1417.

Superville, P.J., Prygiel, E., Magnier, A., Lesven, L., Gao, Y., Baeyens, W., et al. (2014) Daily variations of Zn and Pb concentrations in the DeÛle River in relation to the resuspension of heavily polluted sediments. *Sci. Total Environ.* **470–471**: 600–607.

Tankere-Muller, S., Zhang, H., Davison, W., Finke, N., Larsen, O., Stahl, H., and Glud, R.N. (2007) Fine scale remobilisation of Fe, Mn, Co, Ni, Cu and Cd in contaminated marine sediment. *Mar. Chem.* **106**: 192–207.

Tankere, S.P.C. and Statham, P.J. (1996) Distribution of dissolved Cd, Cu, Ni and Zn in the Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* **32**: 623–630.

Taylor, J.D. and Cunliffe, M. (2016) Multi-year assessment of coastal planktonic fungi reveals environmental drivers of diversity and abundance. *ISME J.* **10**: 2118.

Teeling, H., Fuchs, B.M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C.M., et al. (2012) Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom. *Science (80-.).* **336**: 608–611.

Teitzel, G.M. and Parsek, M.R. (2003) Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic Pseudomonas aeruginosa. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2313–2320.

Telford, R.J., Vandvik, V., and Birks, H.J.B. (2006) Dispersal Limitations Matter for Microbial Morphospecies. *Science (80-.).* **312**: 6.

De Tender, A.C., Devriese, I.L., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., and Dawyndt, P. (2015) Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* **49**: 9629–9638.

De Tender, A.C., Devriese, I.L., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., Cattrijsse, A., et al. (2017) Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* **51**: 7350–7360.

De Tender, A.C., Schlundt, C., Devriese, L.I., Mincer, T.J., Zettler, E.R., and Amaral-Zettler, L.A. (2017) A review of microscopy and comparative molecular-based methods to characterize “Plastisphere” communities. *Anal. Methods* **9**: 2132–2143.

Tessier, A. and Turner, D.R. (1995) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems Chichester.

Tessier, E., Garnier, C., Mullot, J.U., Lenoble, V., Arnaud, M., Raynaud, M., and Mounier, S. (2011) Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon bay (France). *Mar. Pollut. Bull.* **62**: 2075–2086.

Thane Papke, R. and Ward, D.M. (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 293–303.

The Mermex Group, Durrieu de Madron, X., Guieu, C., Sempéré, R., Conan, P., Cossa, D., et al. (2011) Marine ecosystems ' responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Prog. Oceanogr.* **91**: 97–166.

Thingstad, T.F., Zweifel, U.L., and Rassoulzadegan, F. (1998) P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 88–94.

Thomas, B.C., Amano, Y., Probst, A.J., Dudek, N., Brown, C.T., Finstad, K.M., et al. (2016) A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* **1**: 1–6.

Thompson, L.R., Williams, G.J., Haroon, M.F., Shibl, A., Larsen, P., Shorenstein, J., et al. (2017) Metagenomic covariation along densely sampled environmental gradients in the Red Sea. *ISME J.* **11**: 138–151.

Thyssen, M., Grégori, G.J., Grisoni, J.-M., Pedrotti, M.L., Mousseau, L., Artigas, L.F., et al. (2014) Onset of the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea: influence of environmental pulse events on the in situ hourly-scale dynamics of the phytoplankton community structure. *Front. Microbiol.* **5**: 387.

Thyssen, M., Mathieu, D., Garcia, N., and Denis, M. (2008) Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *J. Plankton Res.* **30**: 1027–1040.

Tlili, A. (2013) Signification écologique de la tolérance acquise des communautés microbiennes des biofilms de rivières à une contamination d'origine anthropique.

Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., and Santore, R.C. (2001) Biotic Ligand Model of the Acute Toxicity of Metals. 1. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2383–2396.

Torres, R.J., Abessa, D.M.S., Santos, F.C., Maranho, L.A., Davanso, M.B., do Nascimento, M.R.L., and Mozeto, A.A. (2009) Effects of dredging operations on sediment quality:

Contaminant mobilization in dredged sediments from the Port of Santos, SP, Brazil. *J. Soils Sediments* **9**: 420–432.

Treguer, P. and La Corre, P. (1974) Manual d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'autoanaliseur II, Technicon®. Université.

Treusch, A.H., Demir-Hilton, E., Vergin, K.L., Worden, A.Z., Carlson, C.A., Donatz, M.G., et al. (2012) Phytoplankton distribution patterns in the northwestern Sargasso Sea revealed by small subunit rRNA genes from plastids. *ISME J.* **6**: 481–492.

Treusch, A.H., Vergin, K.L., Finlay, L.A., Donatz, M.G., Burton, R.M., Carlson, C.A., and Giovannoni, S.J. (2009) Seasonality and vertical structure of microbial communities in an ocean gyre. *ISME J.* **3**: 1148–1163.

Trevors, J.T. (1989) The role of microbial metal resistance and detoxification mechanisms in environmental bioassay research. *Hydrobiologia* **188–189**: 143–147.

Turner, A. (2010) Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* **60**: 159–171.

Twining, B.S., Rauschenberg, S., Morton, P.L., and Vogt, S. (2015) Metal contents of phytoplankton and labile particulate material in the North Atlantic Ocean. *Prog. Oceanogr.* **137**: 261–283.

Twiss, M.R., Rattan, K.J., Sherrell, R.M., and Mckay, R.M.L. (2004) Sensitivity of Phytoplankton to Copper in Lake Superior. *J. Great Lakes Res.* **30**: 245–255.

Uitz, J., Claustre, H., Gentili, B., and Stramski, D. (2010) Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. *Global Biogeochem. Cycles* **24**: 1–19.

de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., Logares, R., et al. (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science (80-.).* **348**: 1261605–1261605.

Vasconcelos, T.M.S.D. and Leal, F.M.C. (2001) Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Mar. Chem.* **74**: 65–85.

Vaulot, D., Courties, C., and Partensky, F. (1989) A Simple Method to Preserve Oceanic Phytoplankton for Flow Cytometric Analyses through division by the corresponding parameters. *Cytom. J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **10**: 629–635.

Vaulot, D. and Partensky, F. (1992) Cell cycle distributions of prochlorophytes in the north western Mediterranean Sea. *Deep. Res.* **39**: 727–742.

Veldhuis, M.J.W. and Kraay, G.W. (2000) Application of flow cytometry in marine

phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Sci. Mar.* **64**: 121–134.

Veldhuis, M.J.W., Timmermans, K.R., Croot, P., and Van Der Wagt, B. (2005) Picophytoplankton; A comparative study of their biochemical composition and photosynthetic properties. *J. Sea Res.* **53**: 7–24.

Vergin, K.L., Done, B., Carlson, C.A., and Giovannoni, S.J. (2013) Spatiotemporal distributions of rare bacterioplankton populations indicate adaptive strategies in the oligotrophic ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **71**: 1–13.

Vidal-Durà, A., Burke, I.T., Stewart, D.I., and Mortimer, R.J.G. (2018) Reoxidation of estuarine sediments during simulated resuspension events: Effects on nutrient and trace metal mobilisation. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **207**: 40–55.

Vink, J.P.M. (2009) The origin of speciation: Trace metal kinetics over natural water/sediment interfaces and the consequences for bioaccumulation. *Environ. Pollut.* **157**: 519–527.

Violle, C., Pu, Z., and Jiang, L. (2010) Experimental demonstration of the importance of competition under disturbance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 12925–12929.

Waeles, M., Riso, R.D., Cabon, J.Y., Maguer, J.F., and L'Helguen, S. (2009) Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **84**: 139–146.

Waeles, M., Riso, R.D., and Le Corre, P. (2005) Seasonal variations of cadmium speciation in the Penzé estuary, NW France. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **65**: 143–152.

Waeles, M., Tanguy, V., Lespes, G., and Riso, R.D. (2008) Behaviour of colloidal trace metals (Cu, Pb and Cd) in estuarine waters: An approach using frontal ultrafiltration (UF) and stripping chronopotentiometric methods (SCP). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **80**: 538–544.

Wafo, E., Abou, L., Nicolay, A., Boissery, P., Perez, T., Abondo, R.N., et al. (2016) A chronicle of the changes undergone by a maritime territory, the Bay of Toulon (Var Coast, France), and their consequences on PCB contamination. *Springerplus* **5**: 1230.

Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., and Weinberger, F. (2012) The Second Skin: Ecological Role of Epibiotic Biofilms on Marine Organisms. *Front. Microbiol.* **3**: 1–21.

Walters III, M., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M., and Stewart, P. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 317–323.

Van Wambeke, F., Christaki, U., Giannakourou, A., Moutin, T., and Souvemerzoglou, K. (2002)

Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* **43**: 119–133.

Wan Hussin, W.M.R., Cooper, K.M., Froján, C.R.S.B., Defew, E.C., and Paterson, D.M. (2012) Impacts of physical disturbance on the recovery of a macrofaunal community: A comparative analysis using traditional and novel approaches. *Ecol. Indic.* **12**: 37–45.

Wang, K., Ye, X., Zhang, H., Chen, H., Zhang, D., and Liu, L. (2016) Regional variations in the diversity and predicted metabolic potential of benthic prokaryotes in coastal. *Sci. Rep.* **6**: 38709.

Wang, K., Zhang, D., Xiong, J., Chen, X., Zheng, J., Hu, C., and Yang, Y. (2015) Response of Bacterioplankton Communities to Cadmium Exposure in Coastal Water Microcosms with High Temporal Variability. *Appl. Envioronmental Microbiol.* **81**: 231–240.

Wang, L.-S., Wang, Lin, Wang, Li, Wang, G., Li, Z.-H., and Wang, J.-J. (2009) Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (Triticum aestivum L.) seedlings. *Environ. Toxicol.* **24**: 296–303.

Wang, L., Zhang, J., Li, H., Yang, H., Peng, C., Peng, Z., and Lu, L. (2018) Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci. Total Environ.* **627**: 600–612.

Ward, C.S., Yung, C.M., Davis, K.M., Blinebry, S.K., Williams, T.C., Johnson, Z.I., and Hunt, D.E. (2017) Annual community patterns are driven by seasonal switching between closely related marine bacteria. *ISME J.* **11**: 1412–1422.

Waterbury, J., Watson, S., and Valois, F.D. (1986) Biological and Ecological Characterization of the Marine Unicellular Cyanobacterium Synechococcus. *Can Bull Fish Aquat Sci* **214**: 71–120.

Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 319–346.

Webster, N.S. and Negri, A.P. (2006) Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. *Environ. Microbiol.* **8**: 1177–1190.

Weinbauer, M.G. and Rassoulzadegan, F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity ? *Environ. Microbiol.* **6**: 1–11.

Weisse, T. and Mindl, B. (2002) Picocyanobacteria-sensitive bioindicators of contaminant stress in an alpine lake (Traunsee, Austria). *Water, Air Soil Pollut.* **2**: 191–210.

Wemheuer, F., Taylor, J.A., Daniel, R., Johnston, E.L., Meinicke, P., Thomas, T., and Wemheuer,

B. (2018) Tax4Fun2: a R-based tool for the rapid prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene marker gene sequences. *bioRxiv* **490037**:.

Wenger, A.S., Rawson, C.A., Wilson, S., Newman, S.J., Travers, M.J., Atkinson, S., et al. (2018) Management strategies to minimize the dredging impacts of coastal development on fish and fisheries. *Conserv. Lett.* **11**: 1–10.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority William. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 6578–6583.

Wildgust, M. a. and Jones, M.B. (1998) Salinity change and the toxicity of the free cadmium ion [CD(aq)2+] to Neomysis integer (Crustacea: Mysidacea). *Aquat. Toxicol.* **41**: 187–192.

Williams, T.J., Wilkins, D., Long, E., Evans, F., Demaere, M.Z., Raftery, M.J., and Cavicchioli, R. (2013) The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. *Environ. Microbiol.* **15**: 1302–1317.

Wilson, M. V and Shmida, A. (1984) Measuring Beta Diversity with Presence-Absence Data. *J. Ecol.* **72**: 1055–1064.

Winfield, M.O., Downer, A., Longyear, J., Dale, M., and Barker, G.L.A. (2018) Comparative study of biofilm formation on biocidal antifouling and fouling-release coatings using next-generation DNA sequencing. *Biofouling* **34**: 464–477.

de Wit, R. and Bouvier, T. (2006) “Everything is everywhere, but, the environment selects”; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ. Microbiol.* **8**: 755–758.

Witt, V., Wild, C., and Uthicke, S. (2011) Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiol. Lett.* **323**: 188–195.

Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., et al. (2009) Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* **458**: 623–626.

Won, N. Il, Kim, K.H., Kang, J.H., Park, S.R., and Lee, H.J. (2017) Exploring the impacts of anthropogenic disturbance on seawater and sediment microbial communities in Korean coastal waters using metagenomics analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**: 130.

Wood, E.D., Armstrong, F.A.J., and Richards, F.A. (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **47**: 23–31.

Wood, J.M. and Wang, H.K. (1983) Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.*

17: 582A–90A.

Wright, J.J., Konwar, K.M., and Hallam, S.J. (2012) Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 381–394.

Wurl, O. and Holmes, M. (2008) The gelatinous nature of the sea-surface microlayer. *Mar. Chem.* **110**: 89–97.

Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Schowalter, M., Rosenauer, A., Gilbert, B., et al. (2008) Comparison of the mechanism of toxicity of Zinc oxide and Cerium Oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *Chemie Ing. Tech.* **81**: 1167–1167.

Xu, Y., Sun, Q., Yi, L., Yin, X., Wang, A., Li, Y., and Chen, J. (2014) The source of natural and anthropogenic heavy metals in the sediments of the Minjiang River Estuary (SE China): Implications for historical pollution. *Sci. Total Environ.* **493**: 729–736.

Yachi, S. and Loreau, M. (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 1463–8.

Yan, L., Yu, D., Hui, N., Naanuri, E., Viggor, S., and Gafarov, A. (2018) Distribution of Archaeal Communities along the Coast of the Gulf of Finland and Their Response to Oil Contamination. *Front. Microbiol.* **9**: 15.

Yan, S., Fuchs, B.M., Lenk, S., and Harder, J. (2009) Biogeography and phylogeny of the NOR5 / OM60 clade of Gammaproteobacteria. **32**: 124–139.

Yang, J.L., Li, Y.F., Liang, X., Guo, X.P., Ding, D.W., Zhang, D., et al. (2016) Silver Nanoparticles Impact Biofilm Communities and Mussel Settlement. *Sci. Rep.* **6**: 37406.

Yayanos, A.A. (1995) Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 777–805.

Ye, S., Laws, E.A., and Gambrell, R. (2013) Trace element remobilization following the resuspension of sediments under controlled redox conditions: City Park Lake, Baton Rouge, LA. *Appl. Geochemistry* **28**: 91–99.

Zeng, J., Yang, L., and Wang, W.X. (2010) High sensitivity of cyanobacterium Microcystis aeruginosa to copper and the prediction of copper toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**: 2260–2268.

Zeri, C. and Voutsinou-Taliadouri, F. (2003) Processes affecting the distribution of dissolved trace metals in the North Aegean Sea (Eastern Mediterranean). *Cont. Shelf Res.* **23**: 919–934.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., and Amaral-zettler, L.A. (2013) Life in the “plastisphere”: microbial

communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* **47**: 7137-7146.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014) PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read mergeR. *Bioinformatics* **30**: 614–620.

Zhang, N., Xiao, X., Pei, M., Liu, X., and Liang, Y. (2016) Discordant temporal turnovers of sediment bacterial and eukaryotic communities in response to dredging: Nonresilience and functional changes. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**: 1–15.

Zhang, R., Lau, S.C.K., Ki, J., Thiyagarajan, V., and Qian, P. (2009) Response of bacterioplankton community structures to hydrological conditions and anthropogenic pollution incontrasting subtropical environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **69**: 449–460.

Zhang, R., Liu, B., Lau, S.C.K., Ki, J.-S., and Qian, P.-Y. (2007) Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**: 496–508.

Zhang, W., Ding, W., Li, Y., Tam, C., Bougouffa, S., Wang, R., et al. (2019) Marine biofilms constitute a bank of hidden microbial diversity and functional potential. *Nat. Commun.* **10**: 517.

Zhang, W.P., Wang, Y., Tian, R.M., Bougouffa, S., Yang, B., Cao, H.L., et al. (2014) Species sorting during biofilm assembly by artificial substrates deployed in a cold seep system. *Sci. Rep.* **4**: 1–7.

Zhao, L., Denis, M., Barani, A., Beker, B., Mante, C., Xiao, T., and Gregori, G. (2012) Possible bloom of free trichomes in the Bay of Marseille, NW Mediterranean Sea: An anomaly evidenced by flow cytometry. *J. Plankton Res.* **34**: 711–718.

Zheng, S., Wang, P., Wang, C., Hou, J., and Qian, J. (2013) Distribution of metals in water and suspended particulate matter during the resuspension processes in Taihu Lake sediment, China. *Quat. Int.* **286**: 94–102.

Zhu, F., Massana, R., Not, F., Marie, D., and Vaulot, D. (2005) Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 79–92.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B.M., et al. (2011) Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One* **6**: 1–11.

Zobell, C.E. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* **46**: 39.

Zouch, H., Cabrol, L., Chifflet, S., Tedetti, M., Karray, F., Zaghden, H., et al. (2018) Effect of

Acidic Industrial Effluent Release on Microbial Diversity and Trace Metal Dynamics During Resuspension of Coastal Sediment. *Front. Microbiol.* **9**:.

Zoumis, T., Schmidt, A., Grigorova, L., and Calmano, W. (2001) Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *Sci. Total Environ.* **266**: 195–202.

Zubkov, M. V. and López-Urrutia, A. (2003) Effect of appendicularians and copepods on bacterioplankton composition and growth in the English Channel. *Aquat. Microb. Ecol.* **32**: 39–46.

Zubkov, M. V., Sleigh, M. a., and Burkill, P.H. (2000) Assaying picoplankton distribution by flow cytometry of underway samples collected along a meridional transect across the Atlantic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **21**: 13–20.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications parues

Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., Omanović, D., D'Onofrio, S., Le Poupon, C., Mullot, J-U., Briand, J-F., & Misson, B. (2019). Changes in bacterioplankton communities resulting from direct and indirect interactions with trace metal gradients in an urbanized marine coastal area. *Frontiers in Microbiology,* 10, 257. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00257. Journal impact factor 4.3.

Coclet, C., Garnier, C., Delpy, F., Jamet, D., Durrieu, G., Le Poupon, C., Mayer. M., & Misson, B. (2018). Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. *Progress in Oceanography, 163*, 196-213. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.06.006. Journal impact factor 3.4.

Publications en révision

Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., Omanović, D., D'Onofrio, S., Pasero, E., Le Poupon, C., Mullot, J-U., Misson, B., & Briand, J-F. (In review). Evidence for selective microbial biofilm community structuring by sediment closeness, rather than multichemical contamination or bacterioplankton composition. *Environmental Microbiology*. Journal impact factor 4.9.

Layglon, N., Misson, B., Durrieu, G., **Coclet, C.**, D'Onofrio, S., François, D., Mullot, J-U., Mounier, S., Lenoble, V., Omanović, D., & Garnier, C. (In review). Impact of sediment dredging on seawater quality: a long-term monitoring study of trace metals and microbial community in Toulon Bay (France). *Science of the Total Environment*. Journal impact factor 5.0.

Publications en préparation

Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., Omanović, D., D'Onofrio, S., Pasero, E., Le Poupon, C., Briand, J-F., & Misson, B. Response of bacterioplankton communities to copper and lead exposure in relation with historical exposition: a mesocosm study.

Présentations orales et posters

Coclet, C., Delpy, F., Jamet, D., Durrieu, G., Le Poupon, C., Mayer M., Garnier, C., & Misson, B. (2017). Trace metal elements: major toxic and structuring effects on ultraphytoplanktonic communities in Toulon Bay (France). *Ecotoxicomics Conference*. Valence, France (March 2016).

Coclet, C., Briand, J-F., Durrieu, G., Le Poupon, C., D'Onofrio, S., Omanović, D., Garnier, C., & Misson, B. First evidence of direct and indirect influences of multiple trace metal contaminations on bacterioplankton composition and function in a coastal area. *ISME17*. Leipzig, Germany (August 2018).

Coclet, C., Briand, J-F., Durrieu, G., Le Poupon, C., D'Onofrio, S., Omanović, D., Garnier, C., & Misson, B. Variability of bacterioplankton community along a chemical multicontamination gradient in a north-western coastal Mediterranean environment (Toulon bay, France). *Ecotoxicomics Conference*. Lyon, France (November 2017).

Coclet, C., Misson, B., Durrieu, G., Le Poupon, C., D'Onofrio, S., Garnier, C., & Briand J-F. Influence of a mulcontamination gradient in a North-Western Mediterranean bay (Toulon Bay, France) on biofilm microbial communities analyzed by flow cytometry. *The International Congress on Marine Corrosion and Fouling (ICMCF)*. Toulon, France (June 2016).

Clément COCLET

Institut méditerranéen d'océanologie (MIO), université de Toulon

Matériaux polymères interfaces environnement marin (MAPIEM), Université de Toulon

Impacts de la contamination multiple en éléments traces métalliques sur les communautés microbiennes dans un environnement côtier fortement anthropisé : la rade de Toulon

La rade de Toulon est un écosystème côtier fortement anthropisé qui présente un gradient multiple de contamination en éléments traces métalliques, qui en fait un site atelier remarquable. Le couplage des campagnes de terrain et des expérimentations en laboratoire a permis d'étudier l'impact de la contamination métallique sur les communautés microbiennes planctoniques et en biofilm. L'utilisation de la chimie analytique, de la cytométrie en flux et du métabarcoding a permis d'étudier plusieurs aspects des communautés, comme l'abondance et la diversité taxonomique en réponse à la contamination métallique dans la rade de Toulon. Ainsi, les communautés d'ultraphytoplancton et de bactérioplancton ont montré une structuration spatiale forte le long des gradients métalliques. Les expérimentations en laboratoire ont montré que les ETMs jouaient un rôle important sur l'abondance et la diversité des communautés ultraplanctoniques, par des effets directs (toxicité) et indirects (couplage phytoplancton-bactérioplancton). La communauté microbienne de biofilm a été beaucoup moins impactée par les gradients métalliques dans la rade de Toulon que la communauté ultraplanctonique. En revanche, la communauté de biofilm a semblé influencée par sa proximité avec le compartiment sédimentaire, qui ont pu fournir des microorganismes colonisateurs lors d'épisodes de remise en suspension. En conclusion, les ETMs ont semblé avoir un impact sur l'ensemble des communautés microbiennes de la rade de Toulon avec toutefois, des variations d'influence selon le compartiment.

Mots clés : Éléments traces métalliques, communautés microbiennes, bactérioplancton, ultraphytoplancton, biofilm microbien, écosystème côtier, rade de Toulon

Impacts of multiple contamination of trace metal elements on the microbial communities in a highly anthropized coastal environment: the Toulon bay

Toulon Bay is a highly anthropized coastal ecosystem that present multiple trace metal contamination gradients, and was considered as a model system. The coupling of field campaigns and laboratory experiments were used to study the impact of trace metal contamination on both planktonic and biofilm microbial communities. Chemical analyses, flux cytometry, and metabarcoding were used to study several characteristics of communities, as abundance and taxonomic diversity in response to trace metal contamination in the Toulon Bay. Then, both ultraphytoplankton and bacterioplankton showed strong spatial patterns along the trace metal contamination gradients. Laboratory experiments showed that trace metals played an important role on both abundance and diversity patterns of ultraplanktonic communities, by both potential direct (toxicity) and indirect (phytoplankton-bacterioplankton interactions). Conversely to planktonic communities, trace metal contamination had limited impact on microbial biofilm community. In contrast, microbial biofilm community seemed to be influenced by surrounding sediments, and by potential colonizer taxa from benthic compartment resuspended during sediment resuspension events. In conclusion, trace metals seemed to have impacts on all the microbial communities of Toulon Bay, with variations of influence depending on the compartment.

Keywords: Trace metal elements, microbial communities, bacterioplankton, ultraphytoplankton, microbial biofilm, coastal ecosystem, Toulon bay