



HAL
open science

**Biodisponibilité de la matière organique dissoute pour
les procaryotes hétérotrophes en zone côtière
Méditerranéenne : caractérisation et hiérarchisation des
facteurs de contrôle**

Clara Dignan

► **To cite this version:**

Clara Dignan. Biodisponibilité de la matière organique dissoute pour les procaryotes hétérotrophes en zone côtière Méditerranéenne : caractérisation et hiérarchisation des facteurs de contrôle. Sciences agricoles. Université de Toulon, 2023. Français. NNT : 2023TOUL0009 . tel-04849483

HAL Id: tel-04849483

<https://theses.hal.science/tel-04849483v1>

Submitted on 19 Dec 2024

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*
LABORATOIRE M.I.O. – ÉQUIPES CEM & MEB

THÈSE présentée par :

Clara DIGNAN

Soutenue le : **03 novembre 2023**

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Univers

Spécialité : Écologie microbienne

**Biodisponibilité de la matière organique
dissoute pour les procaryotes hétérotrophes en
zone côtière Méditerranéenne : caractérisation
et hiérarchisation des facteurs de contrôle**

JURY :

Mme. Julie LELOUP , Maître de conférences, Sorbonne Université	Rapporteur
M. Fabien JOUX , Professeur des Universités, Sorbonne Université	Rapporteur
M. Frédéric GARABETIAN , Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Examineur
M. Olivier PRINGAULT , Directeur de recherche, IRD	Examineur
M. Benjamin MISSON , Maître de conférences, UTLN	Directeur de thèse
Mme. Véronique LENOBLE , Maître de conférences, UTLN	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à remercier le Dr. Richard Sempéré (ancien directeur du laboratoire MIO) pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ce laboratoire. Je remercie également la région PACA et Toulon Provence Métropole (TPM) pour l'attribution de cette bourse de thèse.

Je remercie également les membres du jury, notamment la Dr. Julie Leloup et le Pr. Fabien Joux pour avoir accepté de corriger ce travail. Je remercie le Pr. Frédéric Garabetian et le Dr. Olivier Pringault pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je tiens ensuite tout particulièrement à remercier mes co-directeurs de thèse, le Dr. Benjamin Misson et la Dr. Véronique Lenoble pour avoir encadrer cette thèse de manière formidable, pour leur confiance, leurs conseils et leur enthousiasme tout au long de cette thèse.

Ben et Véro, je vous suis extrêmement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi, je ne vous remercierai jamais assez. Merci de m'avoir offert cette opportunité, d'abord un stage puis une thèse, qui m'a permis de dépasser mes limites, d'apprendre énormément et d'aller au bout de mes objectifs. Merci de m'avoir permis d'effectuer une mission en Italie. Merci de m'avoir fait découvrir l'univers des congrès. Merci pour votre soutien sans faille. Merci pour vos nombreux conseils. Je suis chanceuse de vous avoir eu comme encadrants de thèse et c'était un véritable honneur d'avoir pu travailler avec vous deux.

Véro, je voulais te remercier tout particulièrement pour ta bonne humeur exceptionnelle et ton rire communicatif. Tu es une personne solaire, pleine d'énergie et généreuse. Je t'admire beaucoup pour ça. Merci pour ta rigueur scientifique et de m'avoir permis de développer mon côté chimiste.

Ben, merci pour ton énorme soutien tout le long de cette thèse. Tu as un sens poussé de la recherche, tu as été pour moi un puit de connaissances. Tu m'as appris toutes les étapes pour devenir un bon chercheur. Tu m'as toujours poussée pour que je donne le meilleur et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

Merci à tous les membres du laboratoire MIO (actuels et passés) de l'Université de Toulon pour cette ambiance de travail exceptionnelle. Merci à Christian notre compteur d'histoire préféré (promis je m'abonne au magazine « Martino » dès qu'il sortira dans les kiosques). Merci à Benjamin pour ton humour parfois borderline, pour l'analyse de mes centaines d'échantillons, tes conseils et ta bienveillance. Merci à Théo pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton humour toujours second degrés. Merci à Elyne d'avoir partagé avec moi un congrès, des expériences et de nombreux séminaires, tu as regard scientifique admirable. Dans le désordre et par ordre d'arrivée dans mon cerveau : un grand merci à Gaël, Virginie, Steph, Christophe, Marie-Christine, Anne, Léopold, Hélène, Isabelle, Nathalie, Houssam, Roland, Jean Louis, Dominique, Natacha, Amanda, Thays, Marianny, Vinicius. Certains m'ont aidé durant ces 3 années de thèse d'autres ont simplement partagé avec moi ces 3 années de vie et dans les deux cas je les en remercie.

Je souhaite également remercier quelques personnes du laboratoire MAPIEM : Aurélie, Nathan, Jean-François, Annick, Raphaëlle.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Huy Dang de l'Université de Trent, Chiara Santinelli du CNR de Pise, Ingrid Obernester de l'Observatoire de Banyuls et Olivier Pringault du MIO pour le temps que vous m'avez accordé et vos nombreux conseils. Chiara et Giancarlo, merci de m'avoir si bien accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir formée sur les analyses de spectroscopie de fluorescence.

Puis il y a les amis, l'arrivée dans une nouvelle ville qui m'était complètement inconnue m'a permis de faire des rencontres magiques, des amis qui ont été présents quotidiennement pour me changer les idées et mettre mon foie à rude épreuve !! Je pense tout particulièrement à toi Célia, ma meilleure rencontre, une amitié simple, évidente, joyeuse et folle... tu as été mon rayon de soleil, ma bouffée d'oxygène. Avec toi c'était des fous rires à en avoir mal au ventre, une complicité incroyable, une confidente et une oreille attentive pour m'aider à franchir toutes les épreuves et dieu sait qu'il y en a eu ! Même si aujourd'hui tu es partie à plus de 15 000 km de moi tu resteras toujours dans mon cœur, j'aurais toujours une pensée pour toi et je viendrais boxer les Kangourous, et apprivoiser les mygales avec toi dès que je le pourrais ! Je t'aime ! Matilda, d'abord une coloc, toujours la bière à la main et maintenant une véritable amie. Tu m'as toujours donné ton soutien et m'a suivi dans beaucoup de mes conneries. Une campagnarde un peu folle, une répartie incroyable et un caractère bien trempé, surtout reste

comme tu es ! On a encore de nombreuses pintes à boire suivie de nombreuses parties de cache-cache dans les rues de Toulon... tu m'as quand même fait suer plus d'une fois quand j'y pense mais c'est aussi pour ça que je t'aime !

Thibault, tu es maintenant parti retrouver ta ville rose, auprès de Camille et vous attendez un enfant ! Wahou quel changement ! Mon petit Thiny le colocataire rêvé : bordélique, alcoolique, hard style boy, fast food tous les soirs... ce n'était jamais de tout repos avec toi ! Mais tu as aussi été comme un frère pour moi, un confident, un partenaire pour toute activité, un fêtard qui tape du pied. Merci pour tout ce que tu m'as apportée, pour avoir partagé tous ces moments, m'avoir fait découvrir toutes ces personnes ou plutôt tous ces marins d'eau douce complètement déjantés !

Je finirais par remercier tous ces amis qui ont été là de près ou de loin pour me soutenir dans ce travail de thèse ou simplement pour me changer les idées : Yassin, Matthias, Guillaume, Alex, Roxanne, Jonas, Jonah, Alice, Julien, Gael, Lucas, Thais, et j'en oublie sûrement...

Maintenant les amis d'enfance, ceux qui sont là depuis des années, qui m'ont vu grandir, m'épanouir, évoluer, réussir... Un grand merci à Orlane ma colombienne, Manon, Aliénor et Lola. Même si on est loin, même si on ne se voit que de temps en temps, vous restez des piliers essentiels dans ma vie. Je sais qu'on pourra toujours compter les unes sur les autres.

Enfin ma famille, mes parents, papa, maman, mon frère, Arno. Merci d'être là pour moi. De m'avoir toujours soutenue dans mes projets de m'avoir aidée. Maman ta détermination m'a aussi permis d'être là où j'en suis aujourd'hui, alors merci. J'espère que je vous rends fiers. J'essaie de tout faire dans ce sens en tout cas. Toutes ces études et cette thèse c'est aussi pour vous pour vous rendre fiers et vous rendre tout ce que vous m'avez apporté depuis petite. Je vous aime plus que tout, comme un aller-retour entre la terre et la lune... Merci également à mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines et tout particulièrement à Léna. Une petite pensée pour ma petite Siam... tu me dois une paire de lunettes !

J'aimerais finir par remercier une personne qui m'a offert un soutien improbable... Tu as finalement toujours été auprès de moi durant ces trois années de thèse mais tu m'as offert une aide précieuse dans les moments les plus durs où j'en avais réellement besoin. C'est complètement improbable mais tellement magique... Aujourd'hui tu me rends heureuse, je suis épanouie, avec des projets de vie plein la tête et tout ça grâce à toi. Merci infiniment, je t'aime...

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	- 19 -
I. 1. INTRODUCTION	- 19 -
I. 2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	- 20 -
I. 2. 1. <i>Le cycle du carbone</i>	- 20 -
I.2.1.1. A l'échelle planétaire	- 20 -
I.2.1.2. En milieu marin.....	- 22 -
I.2.1.2.1 La pompe à solubilité.....	- 22 -
I.2.1.2.2 La pompe à carbonate	- 23 -
I.2.1.2.3 La pompe biologique	- 23 -
I.2.1.2.4 La pompe microbienne	- 25 -
I. 2. 2. <i>La matière organique dissoute (DOM)</i>	- 26 -
I.2.2.1. La DOM océanique : un élément fondamental du cycle global du carbone	- 26 -
I.2.2.2. Origine de la matière organique dissoute.....	- 27 -
I.2.2.3. Processus de transformation et d'élimination de la DOM dans les océans.....	- 30 -
I.2.2.3.1 Transformations de la DOM par les processus photochimiques	- 30 -
I.2.2.3.2 Transformation de la DOM par les procaryotes hétérotrophes.....	- 30 -
I.2.2.4. Les stratégies écologiques.....	- 32 -
I.2.2.5. Labilité de la DOM comme clef de son devenir en milieu marin.....	- 36 -
I. 2. 3. <i>Les facteurs contrôlant la prise en charge de la DOM par les procaryotes hétérotrophes</i>	- 39 -
I.2.3.1. La limitation par les propriétés des composés organiques.....	- 39 -
I.2.3.2. La limitation par la stœchiométrie	- 40 -
I.2.3.3. La température	- 43 -
I.2.3.4. Les capacités fonctionnelles des communautés	- 43 -
I. 3. OBJECTIFS.....	- 45 -
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	- 47 -
II. 1. LES ZONES COTIÈRES ETUDIÉES	- 47 -
II. 1. 1. <i>La rade de Toulon</i>	- 49 -
II.1.1.1. Le port de Toulon Vieille Darse	- 50 -
II.1.1.2. La Baie du Lazaret.....	- 51 -
II. 1. 2. <i>La Baie du Niel (Presqu'île de Giens)</i>	- 51 -
II. 1. 3. <i>Le port de Carnon</i>	- 51 -
II. 2. PRELEVEMENTS ET ANALYSES CHIMIQUES.....	- 52 -
II. 2. 1. <i>Prélèvement d'eau de mer</i>	- 52 -
II. 2. 2. <i>Mesures in situ des paramètres physico-chimiques de l'eau</i>	- 53 -
II. 2. 3. <i>Mesure des concentrations en nutriments</i>	- 53 -
II.2.3.1. Dosage du carbone organique dissous	- 54 -
II.2.3.2. Dosage de l'azote et du phosphore	- 55 -
II. 3. L'ÉTUDE DE LA DOM	- 56 -
II. 3. 1. <i>Les techniques de spectroscopie de fluorescence pour l'étude de la DOM</i>	- 56 -
II. 3. 2. <i>La matière organique dissoute chromophorique</i>	- 57 -

II.3.3. Diversité moléculaire à haute résolution de la DOM.....	- 59 -
II.4. TECHNIQUES ANALYTIQUES POUR CARACTERISER LA DOM.....	- 61 -
II.4.1. Analyse de la FDOM par fluorescence.....	- 62 -
II.4.1.1. Le phénomène de fluorescence.....	- 62 -
II.4.1.2. L'intensité de fluorescence.....	- 63 -
II.4.1.3. Diffusion de Raman et Rayleigh.....	- 64 -
II.4.1.4. Propriétés de la matière organique fluorescente.....	- 64 -
II.4.1.5. Les fluorophores d'intérêts de la DOM.....	- 66 -
II.4.1.5.1 Fluorescence des composés de type substances humiques.....	- 67 -
II.4.1.5.2 La fluorescence des composés protéiques.....	- 68 -
II.4.1.6. Caractéristiques du spectrofluorimètre.....	- 69 -
II.4.1.7. Méthodes d'interprétation des spectres de fluorescence.....	- 69 -
II.4.2. Analyse moléculaire de la DOM.....	- 70 -
II.4.2.1. La spectrométrie de masse à haute résolution.....	- 70 -
II.4.2.2. Principes de fonctionnement.....	- 71 -
II.4.2.3. L'analyseur Orbitrap.....	- 72 -
II.4.2.4. Le spectre de masse.....	- 74 -
II.4.2.5. Traitement des spectres de masse.....	- 74 -
II.5. CARACTERISATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES.....	- 75 -
II.5.1. Estimation de l'abondance des microorganismes par cytométrie en flux.....	- 75 -
II.5.1.1. Marquage des cellules.....	- 76 -
II.5.1.2. L'instrument BD Accuri™ C6.....	- 76 -
II.5.2. Approche moléculaire pour l'étude de la diversité microbienne.....	- 77 -
II.5.2.1. Extraction d'ADN.....	- 78 -
II.5.2.2. Amplification de l'ADN extrait par PCR.....	- 78 -
II.5.2.3. Séquençage haut débit des produits de PCR.....	- 79 -
II.5.2.4. Traitement bio-informatiques des séquences ADN.....	- 81 -
II.6. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES.....	- 84 -
CHAPITRE III. EVALUER LA VARIABILITÉ SPATIO-TEMPORELLE DES PROPRIÉTÉS DE LA	
MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE.....	- 87 -
III.1. AVANT-PROPOS.....	- 87 -
III.2. AN EFFECT-BASED METHOD TO EVALUATE SPATIO-TEMPORAL VARIATIONS OF COASTAL MARINE DOM	
PROPERTIES.....	- 90 -
III.2.1. Abstract.....	- 91 -
III.2.2. Introduction.....	- 91 -
III.2.3. Materials and Methods.....	- 93 -
III.2.4. Results and discussion.....	- 96 -
III.3. ÉVOLUTION DE CETTE APPROCHE EXPERIMENTALE AU COURS DE LA THESE.....	- 100 -
III.4. VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUE DANS DES ENVIRONNEMENTS	
COTIERS CONTRASTES ET SON INFLUENCE SUR LA BASE HETEROTROPHE DU RESEAU TROPHIQUE.....	- 101 -
III.4.1. Hypervariable DOM properties in coastal NW Mediterranean Sea-Evidences of strong human	
influences and potential consequences for the heterotrophic base of planktonic food webs.....	- 102 -

III.4.1.1. Abstract	- 103 -
III.4.1.2. Introduction	- 103 -
III.4.1.3. Material and methods	- 105 -
III.4.1.3.1 Study area and sample collection.....	- 105 -
III.4.1.3.2 Experimental design.....	- 107 -
III.4.1.3.3 Chemical analysis for field samples.....	- 108 -
III.4.1.3.4 Heterotrophic prokaryotes abundances (HPA) during incubation	- 109 -
III.4.1.3.5 Statistical analyses	- 109 -
III.4.1.4. Results and discussion.....	- 110 -
III.4.1.4.1 Spatial and temporal variability in DOM chemical properties and potential sources.....	- 110 -
III.4.1.4.2 Stimulation potential of the heterotrophic basis of the planktonic food web	- 114 -
III.4.1.5. Conclusion.....	- 119 -
III.4.1.6. Supplementary materials	- 120 -
III. 5. CONCLUSION DU CHAPITRE	- 126 -
CHAPITRE IV. HIÉRARCHISER LES FACTEURS RESPONSABLES DES VARIATIONS DE LABILITÉ DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE	- 127 -
IV. 1. AVANT-PROPOS	- 127 -
IV. 2. UNRAVELING THE MAJOR CONTROL OF N-CONTAINING INORGANIC AND ORGANIC MOLECULES ON DOM BIOAVAILABILITY IN A MEDITERRANEAN COASTAL ENVIRONMENT	- 128 -
<i>IV. 2. 1. Abstract</i>	<i>- 129 -</i>
<i>IV. 2. 2. Introduction</i>	<i>- 129 -</i>
<i>IV. 2. 3. Material and methods.....</i>	<i>- 131 -</i>
IV.2.3.1. Sample collection.....	- 131 -
IV.2.3.2. Experimental design.....	- 132 -
IV.2.3.3. EEM-PARAFAC analyses, DOC and nutrient concentrations	- 133 -
IV.2.3.4. DOM molecular characterization and data processing	- 134 -
IV.2.3.5. Biological analysis	- 136 -
IV.2.3.5.1 Abundance, flow cytometry.....	- 136 -
IV.2.3.5.2 Taxonomic diversity, metabarcoding	- 136 -
IV.2.3.6. Statistical analyses	- 137 -
<i>IV. 2. 4. Results</i>	<i>- 138 -</i>
<i>IV. 2. 5. Discussion</i>	<i>- 150 -</i>
IV.2.5.1. DIN and DOP influence DOM fate under equivalent DOC concentration.....	- 150 -
IV.2.5.2. Insights into the influence of DOM molecular composition on its fate.....	- 152 -
IV.2.5.3. The dynamics of HP community structure is determined by the dissolved substances properties.....	- 155 -
<i>IV. 2. 6. Supplementary materials.....</i>	<i>- 156 -</i>
IV. 3. CONCLUSION DU CHAPITRE	- 164 -
CHAPITRE V. TRACER LES SOURCES DES FACTEURS CONTRÔLANT LE DEVENIR DE LA DOM	- 165 -
V. 1. AVANT-PROPOS.....	- 165 -

V.2. INFLUENCE OF THE SEDIMENTARY COLUMN ON DOM PROPERTIES AND THE FUNCTIONING OF THE HETEROTROPHIC BASE OF THE PLANKTONIC FOOD WEB.....	- 167 -
V.2.1. <i>Abstract</i>	- 168 -
V.2.2. <i>Introduction</i>	- 168 -
V.2.3. <i>Material and methods</i>	- 170 -
V.2.3.1. Study area and sample collection	- 170 -
V.2.3.2. Laboratory incubation experiments.....	- 172 -
V.2.3.3. Chemical analysis.....	- 172 -
V.2.3.4. Heterotrophic prokaryotes abundances (HPA).....	- 173 -
V.2.3.5. Statistical analyses.....	- 174 -
V.2.4. <i>Results & discussion</i>	- 174 -
V.2.5. <i>Supplementary materials</i>	- 182 -
V.3. PERSPECTIVES POUR COMPRENDRE L'INFLUENCE REELLE DES SEDIMENTS SUR LES PROPRIETES CHIMIQUES ET LA CROISSANCE DES PROCARYOTES HETEROTROPHES	- 183 -
V.4. RE-SUSPENSION OF MEDITERRANEAN HARBOUR SEDIMENTS: A SOURCE OF PHOSPHATES THAT STIMULATES THE HETEROTROPHIC BASE OF THE PLANKTONIC MARINE FOOD WEB	- 184 -
V.4.1. <i>Abstract</i>	- 185 -
V.4.2. <i>Introduction</i>	- 186 -
V.4.3. <i>Material and methods</i>	- 188 -
V.4.3.1. Study area and sample collection	- 188 -
V.4.3.2. Laboratory resuspension experiments	- 189 -
V.4.3.3. Laboratory incubation experiments.....	- 190 -
V.4.3.4. Chemical analyses	- 191 -
V.4.3.5. Heterotrophic prokaryotes abundances (HPA).....	- 192 -
V.4.3.6. Statistical analyses.....	- 192 -
V.4.4. <i>Results & discussion</i>	- 193 -
V.4.4.1. Variations of physicochemical parameters during sediment/seawater mixing	- 193 -
V.4.4.2. Resuspension pulse stimulates the growth of heterotrophic prokaryotes.....	- 198 -
V.5. CONCLUSION DU CHAPITRE	- 202 -
CHAPITRE VI. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	- 203 -
VI.1. RAPPEL DES OBJECTIFS DE LA THESE	- 203 -
VI.2. HETEROGENEITE SPATIO-TEMPORELLE DES FACTEURS ABIOTIQUES EN ZONE COTIERE.....	- 204 -
VI.2.1. <i>Variations temporelles</i>	- 204 -
VI.2.2. <i>Variations spatiales</i>	- 207 -
VI.2.3. <i>Les sédiments, une source potentielle de nutriments</i>	- 208 -
VI.2.4. <i>Perspectives pour mieux comprendre la variabilité spatio-temporelle des facteurs abiotiques</i> - 210	-
VI.3. LA QUALITE DE LA DOM EST UN BON INDICATEUR DE SA BIODISPONIBILITE EN MILIEU COTIER MEDITERRANEEN	- 211 -
VI.4. LA QUANTITE DE NUTRIMENTS INFLUENCE LES CAPACITES DE PRISE EN CHARGE DE LA DOM PAR LES MICROORGANISMES DANS UNE ZONE COTIERE MEDITERRANEENNE	- 214 -

<i>VI.4.1. Disponibilité en azote et en phosphore</i>	<i>- 214 -</i>
<i>VI.4.2. Perspectives pour évaluer l'influence respective de l'azote et du phosphore</i>	<i>- 216 -</i>
VI.5. LA STRUCTURE DE LA COMMUNAUTE ET LE DEVENIR DU CARBONE	- 217 -
<i>VI.5.1. Est-ce la disponibilité en substances nutritives dissoutes ou la contamination métallique qui façonne les communautés dans les zones côtières ?</i>	<i>- 217 -</i>
<i>VI.5.2. Perspectives pour mieux comprendre le devenir de la DOM à travers la boucle microbienne -</i>	<i>218</i>
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 221 -
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	- 281 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS – FIGURES

Figure I.1 : Représentation schématique simplifiée du cycle global du carbone. Les estimations chiffrées représentent les stocks de carbone en pétagrammes de carbone (1 PgC = 10^{15} gC) et les échanges annuels de carbone (en PgC.an⁻¹). Les nombres et les flèches en noir renseignent les réservoirs et les flux naturels. Les nombres et les flèches en rouge sont des contributions anthropiques. Ces flux sont des modifications du cycle du carbone depuis l'ère industrielle (post 1750). Les incertitudes à 90% de l'intervalle de confiance ont été reportées. (Ciais et al. 2013 ; IPCC, 2014) _____ - 21 -

Figure I.2 : Schéma de la circulation océanique de l'Atlantique (modifié de ocean-climate.org). _____ - 23 -

Figure I.3 : Représentation schématique de la pompe biologique du carbone dans l'océan (Cavan et al., 2019). - 25 -

Figure I.4 : Taille du continuum de la matière organique, particulaire et dissoute, dans l'océan (Verdugo et al., 2004). _____ - 27 -

Figure I.5 : Image satellite de la distribution de la chlorophylle a océanique mondiale en février 2022 (Nasa – earth observatory). _____ - 29 -

Figure II.1 : Représentation schématique de la DOM chromophorique et fluorescente (CDOM et FDOM, respectivement). (Stedmon et Alvarez-Salgado, 2011) _____ - 58 -

Figure II.2 : Diagramme de van Krevelen représentant les régions associées à certains composants biomoléculaires majeurs déterminées selon leurs compositions élémentaires (Kim et al., 2003). _____ - 61 -

Figure II.3 : Diagramme de Jablonski-Perrin (d'après Rouessac et al., 2004) _____ - 63 -

Figure II.4 : Présentation schématique de la technologie orbitrap. L'orbitrap est basé sur des paquets d'ions pulsés, produits par le C-trap, qui sont introduits et capturés dans l'analyseur. Les ions sont maintenus dans un mouvement orbitrap tandis que le champ électrique appliqué maintient les ions dans un mouvement oscillant et produit des signaux vers les plaques réceptrices. Les signaux sont transformés par Fourier en données spectrales de masse (Beck et al., 2019). _____ - 73 -

Figure II.5 : Présentation des principales étapes de base du séquençage par la technique Illumina MiSeq. Source : <https://www.intechopen.com/chapters/49419>. _____ - 81 -

Figure II.6 : Schéma conceptuel du traitement des données de séquençage des amplicons du gène de l'ARNr 16S bactérien 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. ____ - 82 -

Figure III.1: Location of the sampling stations. H: Harbour area under high anthropogenic and continental influences. O: open area under low anthropogenic and continental influences. Mar, jul and nov: sampling campaigns of March, July and November, respectively. _____ - 93 -

Figure III.2: Schematic representation of the experimental design. At each sampling date, two seawater samples were taken from two contrasted stations. The heterotrophic prokaryotic communities and the pool of dissolved substances were isolated by filtration through 0.7 μm and 0.2 μm filters, respectively. Experimental mixtures were then made by exposing each community to each pool of dissolved substances, in triplicates. _____ - 95 -

Figure III.3: DOC concentration in the sampled waters for each campaign. Error bars represent standard error calculated from replicated measurements. Letters above error bars represent the result of Tukey multiple comparisons, the absence of common letters indicating a significant difference (p -value < 0.05). _____ - 97 -

Figure III.4: Net bacterial growth as a function of DOM origin for each campaign. HP origin is specified on the right-hand side, one panel corresponding to one community. H: harbour. O: open coastal area. Orange bars: DOM from H. Blue bars: DOM from O. Error bars represent the standard deviation between experimental triplicates. a, b and c represent the result of Tukey post-hoc multiple comparisons within the same block, the absence of common letters indicating significant difference (p < 0.05). _____ - 98 -

Figure III.5: Principal component analysis of the variation of DOM properties through time and space. H: harbour; O: open area. Indicated sampling dates correspond to 2022. _____ - 111 -

Figure III.6: Correlation analysis between variations in DOM chemical properties and the considered sources. C1 to C4 are representing the fluorescent components identified with PARAFAC: marine humic-like, tryptophan-like, terrestrial fulvic-like and tyrosine-like, respectively. The color scale corresponds to Spearman's correlation coefficients. 1, 2 and 3 stars represent a p -value < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively. _____ - 113 -

Figure III.7: Maximum heterotrophic prokaryotes abundance (mHPA) as a function of DOM origin for each campaign. HP origin is specified by point shapes, circles: Harbour (H); triangles: Open area (O). DOM origin is specified by point colours, orange: Harbour (H); blue: Open area (O). Error bars represent the standard deviation between experimental triplicates. _____ - 115 -

Figure III.8: Correlation analysis between HP growth, DOM properties, other constraining factors and the considered tracers of potential sources of dissolved resources. mHPA: maximal heterotrophic prokaryotes abundance, EG: early growth (between 0 and 24h), IG: intermediate growth (between 24 and 48h), LG: late growth (between 48 and 72h). The color scale corresponds to Spearman correlation coefficients. 1, 2 and 3 stars represent a p -value < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively. _____ - 118 -

Figure III.9: Correlation analysis between HP growth with water from Toulon harbour and the considered tracers of potential sources of dissolved resources. mHPA: maximal heterotrophic prokaryotes abundance, EG: early growth (between 0 and 24h), IG: intermediate growth (between 24 and 48h), LG: late growth (between 48 and 72h). The color scale corresponds to Spearman correlation coefficients. 1, 2 and 3 stars represent a p -value < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively. _____ - 119 -

Figure S.I. III.10 : Fluorescence signatures of the four PARAFAC components identified: (A) C1 marine humic-like, (B) C2 tryptophan-like, (C) C3 terrestrial fulvic-like, (D) C4 Tyrosine-like. Contour plots of components C1 - C4 are ordered by decreasing percent explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation on the x-

axis, and shading representing the relative intensity of emission. Corresponding line plots to the right of each contour plot represent the excitation (black curve) and emission (blue curve) spectra of each component. The x-axis in the line plots is excitation or emission wavelength, with relative intensity on the y-axis. _____ - 121 -

Figure S.I. III.11: Comparison of the temporal dynamics of abiotic parameters between harbour area (\square) and open area (\circ). (A) Dissolved Organic Carbon (DOC), (B) Dissolved Organic Nitrogen (DON), (C) Dissolved Organic Phosphorus (DOP), and Fluorescence intensity of (D) C1_{MarHum-like}, (E) C2_{Trp-like}, (F) C3_{TerFul-like} and (G) C4_{Tyr-like} identified by PARAFAC analysis. Error bars denote standard error of triplicate analyses. _____ - 122 -

Figure S.I. III.12: Comparison of the temporal dynamics of abiotic parameters between harbour area (\square) and open area (\circ). (A) Salinity, (B) Chlorophyll a, (C) Copper (Cu) concentration, (D) Lead (Pb) concentration. _____ - 123 -

Figure S.I. III.13: Heterotrophic prokaryote abundances (HPA) as a function of DOM and community origin for each campaign. HP origin is specified by point shapes. Circles: Harbour HP. Triangles: Open area HP. DOM origin is specified by point colours. Orange: Harbour DOM. Blue: Open area DOM. Error bars represent the standard deviation between experimental triplicates. _____ - 124 -

Figure S.I. III.14: Comparison of the temporal dynamics of abiotic parameters between harbour area (\square) and open area (\circ). (A) Nitrate (NO_3^-), (B) Phosphate (PO_4^{3-}), (C) Temperature. _____ - 125 -

Figure IV.1: Comparison of the abiotic parameters dynamics at the initial (filled colours) and final (fine hatch) time of the incubation experiment for each condition. (A) Dissolved organic carbon (DOC) concentrations, (B) phosphate (PO_4^{3-}) concentrations, (C) nitrate (NO_3^-) concentrations, (D) nitrite (NO_2^-) concentrations, (E) dissolved organic phosphate (DOP) concentrations, (F) dissolved organic nitrogen (DON) concentrations. Error bars denote standard deviation of triplicated experiments. The stars represent a significant difference between initial and final incubation time. _____ - 139 -

Figure IV.2: (A) Fluorescence signatures of the four PARAFAC identified components: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 Tyrosine-like. Contour plots of components C1 – C4 are ordered by decreasing percent explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing the relative intensity of emission. (B) Relative changes of fluorescent intensity at the beginning (filled colours), after four days (large hatch) and at the end (fine hatch) of the incubation for each condition. The stars represent a significant difference with initial incubation time. _____ - 141 -

Figure IV.3: Percentage of labile compounds of the dissolved organic matter in each condition at the initial (filled colours) and final (fine hatch) incubation time determined according to the molecular lability boundary (MLB) among (A) all elementary formulas combined, (B) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and phosphate (CHNOP) and (C) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulphate (CHNOS). Error bars denote standard deviation of triplicate analyses. _____ - 143 -

Figure IV.4: Van Krevelen diagram showing the dynamics of the molecules composing dissolved organic matter under each condition. The left panels represent the molecules significantly consumed during the incubation while the right panels represent the molecules significantly produced during the incubation. The molecules are coloured according to their molecular family. The size of the dots is proportional to the variation factor of a molecule between the initial and final incubation time. _____ - 145 -

Figure IV.5: Heterotrophic prokaryotes abundance (HPA) for each condition during the incubation experiment. Errors bars refer to the standard deviation among the replicates. _____ - 146 -

Figure IV.6: (A) Shannon index values calculated from 16SrRNA OTU table for each condition at initial incubation time (circle), after four days of incubation (square) and at final incubation time (triangle). (B) Structure of prokaryotic community at the family level for each condition. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples. _____ - 147 -

Figure IV.7: Heat tree illustrating the overall taxonomy of the heterotrophic prokaryote community of OinO condition (open area community in its own water) relative to that of HinH condition (harbour community in its own water). Only taxa with a relative abundance greater than 1% were considered in the construction of the heat tree. Nodes represent taxonomic levels and branches represent the affiliations. Color changes represent the difference in log₂ ratio of median proportions of reads between OinO and HinH conditions. The blue nodes are more represented in the OinO condition, while red nodes are more represented in the HinH condition. The gray nodes appear equally in both conditions. _____ - 149 -

Figure S.I. IV.8: Volcano plot of the molecules identified by FTICRMS for each condition. The volcano plot shows the fold-change (x-axis) versus the significance (y-axis) of the identified molecules in (A) HinH, (B) OinH, (C) OinO and (D) HinO conditions. The significance and the fold-change are converted to $-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$ and $\text{Log}_2(\text{fold-change})$, respectively. The vertical and horizontal dotted lines show the cut-off of fold-change = 0, and of p-value = 0.05, respectively. _____ - 158 -

Figure S.I. IV.9: Percentage of refractory compounds of the dissolved organic matter in each condition at the initial (filled colors) and final (hatch) incubation time determined according to the molecular lability boundary (MLB) among (A) all elementary formulas combined, (B) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and phosphate (CHNOP) and (C) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulphate (CHNOS). Error bars denote standard deviation of triplicate analyses. _____ - 160 -

Figure S.I. IV.10: Van Krevelen diagram showing the molecules composing dissolved organic matter allowing to explain the initial differences between the two sites. The left panel represents the molecules preferentially present in Harbour area while the right panel represents the molecules preferentially present in the open area. The molecules are coloured according to their molecular family. The size of the dots is proportional to the variation factor of a molecule between the two sites. _____ - 161 -

Figure S.I. IV.11: Principal coordinate analysis (PCoA) plots derived from (A) DOM molecular composition in each condition and at the beginning and the end of the incubation experiment and (B) from prokaryotic community

composition in each condition and at the beginning, after 4 days of incubation and at the end of the incubation experiment. _____ - 161 -

Figure S.I. IV.12: Fraction of molecules (A) significantly consumed and (B) significantly produced according to the different molecular groups for each experimental condition. _____ - 162 -

Figure S.I. IV.13: Fraction of molecules (A) significantly consumed and (B) significantly produced according to the number of nitrate (N), phosphor (P) and sulfur (S) in their molecular formula for each experimental condition. _____ - 162 -

Figure S.I. IV.14: Heat tree illustrating the overall taxonomy of the heterotrophic prokaryote community of (A) OinO condition (open area community in its own water) relative to that of OinH condition (open area community in harbour dissolved substances), (B) HinH condition (harbour community in its own water) relative to that of HinO condition (harbour community in open area dissolved substances). Color changes represent the difference in log₂ ratio of median proportions of reads between conditions. The gray nodes are equally present in both conditions. _____ - 163 -

Figure V.1: Mapping of the study site and sampling stations _____ - 171 -

Figure V.2: variation in the heterotrophic prokaryotes abundances (HPA) during the incubation experiment. The conditions have been grouped according to the areas where the dissolved substances have been sampled: in the harbour area in red, near the coast in orange, in the north of Lazaret Bay in yellow, near aquaculture in brown and in the open area of Toulon Bay in blue. On the boxplots, the boxes represent the first (Q1) and third (Q3) quartiles, the band inside the boxes represents the median values. Whiskers represent minimum and maximum values while closed circles represent outliers. _____ - 175 -

Figure V.3: heatmap of the correlation intensity between the physico-chemical parameters studied and the maximum density of heterotrophic prokaryotes during incubation experiments. The correlations were calculated from 39 values corresponding to 13 tripled experimental conditions. The color scale corresponds to Spearman's correlation coefficients. The absence of a cross corresponds to a correlation with a p-value < 0.05. _____ - 176 -

Figure V.4 : Differences in DON (A), DOP (B), DIN (C), DIP (D) and DOC (E) concentrations between the final and initial time of the incubation experiment for each sampling area. The absence of a bar means that no consumption has been detected. _____ - 179 -

Figure V.5: (A) Fluorescence signatures of the four compounds identified by PARAFAC analysis: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 tyrosine-like. The contour plots of the C1 - C4 components are ordered by decreasing percentage explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing relative emission intensity. (B) Differences in fluorescence intensities between the final and initial time of incubation for each sample area. _____ - 181 -

Figure V.6 : Map of the study site and sampling points. C: sea water from outside the harbour, SS: sandy sediments, SF_O: old fine sediments, SF_R: recent fine sediments. _____ - 189 -

Figure V.7 : Experimental design _____ - 191 -

Figure V.8 : variation in DOC (A), DON (B) and DOP (C), phosphate (D), nitrate (E) and nitrite (F) concentrations during sediment/seawater mixing under different conditions. Significant differences from the initial time of each condition are indicated by a star. _____ - 195 -

Figure V.9 : (A) Fluorescence signatures of the four compounds identified by PARAFAC analysis: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 tyrosine-like. The contour plots of the C1 - C4 components are ordered by decreasing percentage explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing relative emission intensity. (B) Relative changes in fluorescent intensity during sediment resuspension simulation for each condition. The stars represent a significant difference with the initial incubation time. _____ - 197 -

Figure V.10 : Heterotrophic prokaryotes abundance (HPA) for each condition during the incubation experiment. The error bars refer to the standard deviation between the replicates. _____ - 198 -

Figure V.11: Comparison of the DOC concentration dynamics at the initial (filled colors) and final (thin hatching) time of the incubation experiment for each condition. Error bars indicate the standard deviation of triplicate experiments. The stars represent a significant difference between the initial and final incubation time. ____ - 199 -

Figure V.12 : (A) Fluorescence signatures of the four components identified by PARAFAC analysis: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 tyrosine-like. The contour plots of the C1 - C4 components are ordered by decreasing percentage explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing relative emission intensity. (B) Relative changes in fluorescent intensity at the initial and final time of the incubation experiment for each condition. The stars represent a significant difference with the initial incubation time. _____ - 200 -

TABLE DES ILLUSTRATIONS - TABLEAUX

Tableau II.1 : Emplacements des pics et des régions couramment référencés pour les composants des matrices d'excitation-émission (EEM) obtenus pour la matière organique dissoute marine (Coble, 2007 ; Stedmon et al., 2003). _____ - 59 -

Tableau II.2 : Principaux composants fluorescents identifiés dans les environnements côtiers du monde entier. _ - 67 -

Tableau II.3 : Quelques caractéristiques des principaux HR-MS. _____ - 71 -

Tableau II.4 : Description des outils statistiques et des packages utilisés durant cette thèse _____ - 85 -

Table S.I. IV.1: Average (\pm SD) temperature, salinity, chlorophyll *a*, dissolved organic carbon (DOC), nitrite, nitrate, phosphate, dissolved organic phosphate (DOP), dissolved organic nitrate (DON), total nitrogen and phosphate ratio, DOC and DON ratio, fluorescence intensity of component marine humic-like, terrestrial fulvic-like, tyrosine-like and tryptophan-like, percentage of labile and refractory molecules estimated using the molecular lability bound (MLB) and heterotrophic prokaryote abundance (HPA) assessed in the open area and harbour area. _____ - 159 -

Table V.1: Activities of radium isotopes ^{224}Ra ($T_{1/2} = 3.66$ days) and ^{223}Ra ($T_{1/2} = 11.4$ days) measured in Lazaret Bay. The activities as well as the errors are expressed in disintegrations per minute and per 100 L of sea water (dpm/100L) _____ - 177 -

CHAPITRE I.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1. Introduction

Le cycle du carbone est un cycle biogéochimique majeur en termes de flux et d'importance écologique. Il est actuellement perturbé par les activités humaines qui accentuent l'accumulation de carbone sous forme de CO₂ dans l'atmosphère. Le CO₂ est un gaz à effet de serre et son accumulation est reconnue comme le principal moteur du réchauffement climatique global actuel, avec des conséquences socio-économiques majeures. Les océans assurent un service écosystémique dit de régulation, en piégeant une partie du CO₂ émis dans l'atmosphère, contrebalançant ainsi l'impact de l'Homme sur le climat. Ce service écosystémique est contrôlé par une combinaison de processus physiques, chimiques et biologiques parmi lesquels les activités microbiennes tiennent une place importante. Via la photosynthèse, le phytoplancton transforme le CO₂ en matière organique. Une part importante de cette matière organique phytoplanctonique est excrétée dans le milieu sous forme de matière organique dissoute (DOM), rejoignant le pool de DOM d'origine terrigène apporté par les bassins versants via le lessivage des sols. La DOM représente une quantité de carbone semblable à celle contenue dans l'atmosphère sous forme de CO₂ et joue donc un rôle clef dans le cycle global du carbone. La compréhension de sa composition, de sa distribution et de sa réactivité représente des enjeux scientifiques majeurs. Dans l'océan, la DOM est prise en charge par les procaryotes hétérotrophes selon trois voies : la production de biomasse, la transformation en DOM non utilisable et la minéralisation en CO₂ (l'océan est ainsi également une source de CO₂ atmosphérique). Ces différentes contributions microbiennes respectent des équilibres naturels influencés par les saisons et la disponibilité en ressources nutritives.

Le milieu océanique est pour l'essentiel très peu nutritif (oligotrophe). Cependant, les zones côtières sont des zones où le cycle de la DOM est plus actif en raison d'une plus forte productivité, des apports continentaux (*e.g.* rivières, lessivage des sols) et d'un recyclage rapide. Les zones côtières subissent également une artificialisation toujours plus importante, notamment sur les littoraux méditerranéens. La nécessité de protéger les infrastructures et les

navires se traduit le plus souvent par la construction d'entraves à l'hydrodynamisme naturel, qui a pour conséquence d'augmenter le temps de séjour de l'eau par rapport à la situation naturelle et *in fine* de concentrer les apports continentaux et anthropiques le long des côtes. Avec une augmentation du temps de séjour de quelques heures à quelques jours, cette combinaison de pressions anthropiques peut suffire pour entraîner des perturbations écologiques et biogéochimiques. De récentes études ont démontré que dans des zones sous forte pression anthropique comme les zones portuaires, la diversité microbienne était modifiée. Si des liens avec des contaminants chimiques toxiques (*e.g.* éléments traces métalliques, hydrocarbures) ont été mis en évidence, ces travaux ont également suggéré l'influence de dérèglements biogéochimiques avec des gradients très importants à relativement petite échelle spatiale. Cependant, bien que très accessibles, ces zones côtières paraissent peu attractives pour la communauté scientifique et sont très peu étudiées. C'est dans ce contexte général que s'inscrivent les travaux de cette thèse, qui s'intéressera à la variabilité spatio-temporelle des propriétés de la DOM en zone côtière et de leur influence sur le fonctionnement de la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique, un pilier du cycle de la DOM marine.

I.2. Synthèse bibliographique

I.2.1. Le cycle du carbone

I.2.1.1. A l'échelle planétaire

Le cycle global du carbone implique une série de processus physiques, chimiques et biologiques, qui contribuent aux flux et aux transformations du carbone entre les 4 grands compartiments de la Terre : lithosphère, atmosphère, biosphère et hydrosphère (*Figure 1.1*). Ces réservoirs sont caractérisés comme des sources ou des puits de carbone. Le cycle global du carbone était considéré comme équilibré avant l'ère industrielle. Cependant, depuis le début de la révolution industrielle au XVIIIe siècle, la concentration en CO₂ atmosphérique a considérablement augmenté, passant de 277 ppm à 420 ppm en mars 2023 (valeurs récemment enregistrées à l'observatoire de Mauna Loa, Hawaï, États-Unis ; <https://www.co2.earth/>). Cette augmentation est liée aux nombreux changements induits par les activités humaines (*Rhein et al., 2013 ; Pörtner et al., 2014*). Environ 30% des émissions anthropiques de CO₂ sont absorbées par les mers et océans (*Le Quéré et al., 2009 ; 2015*), ce qui contribue ainsi à ralentir les changements climatiques induits par ce gaz à effet de serre. L'océan est donc un

réservoir primordial à investiguer pour mieux comprendre le cycle global du carbone (Figure I.1).

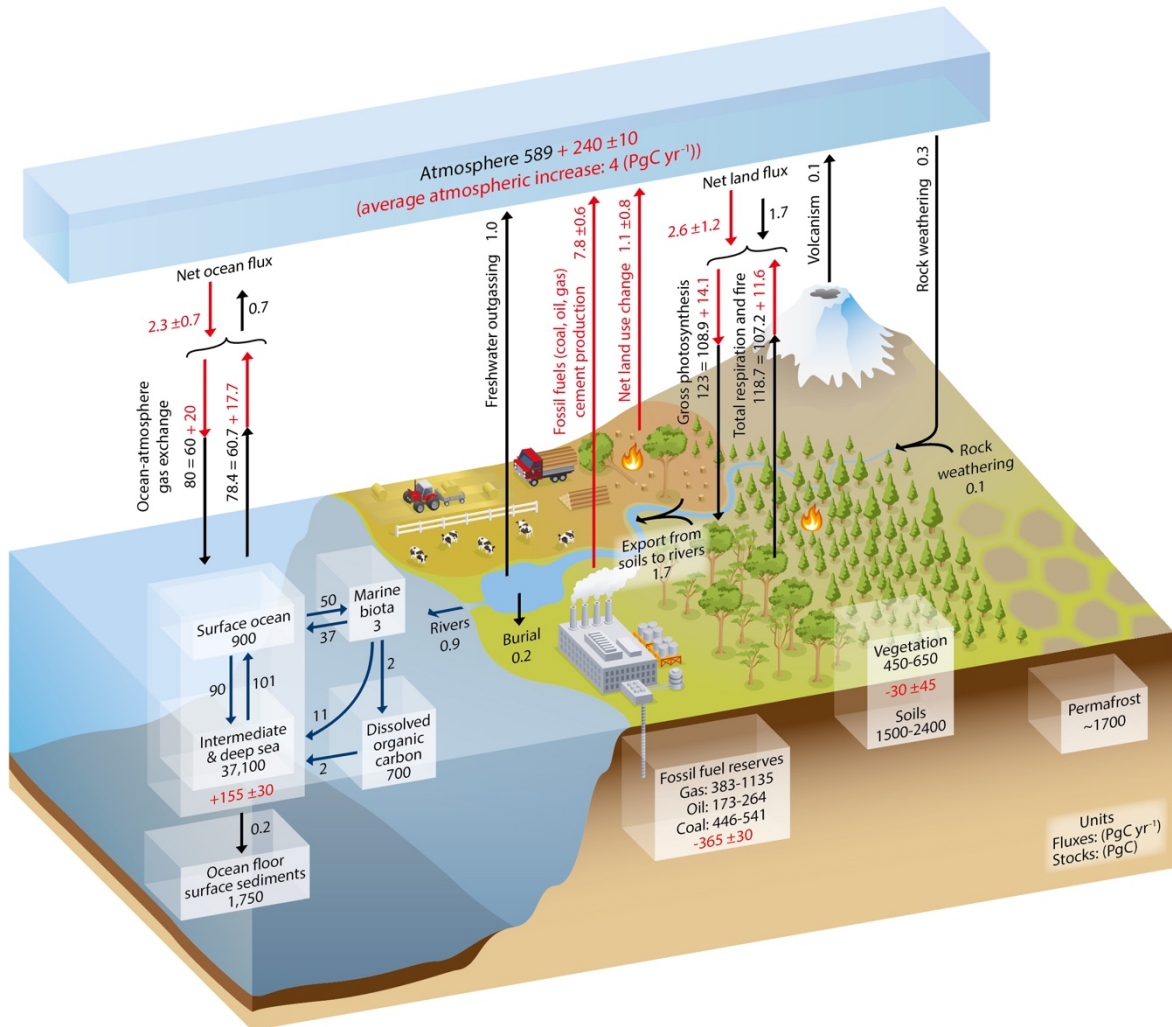


Figure I.1 : Représentation schématisée simplifiée du cycle global du carbone. Les estimations chiffrées représentent les stocks de carbone en pétagrammes de carbone (1 PgC = 10¹⁵ gC) et les échanges annuels de carbone (en PgC.an⁻¹). Les nombres et les flèches en noir renseignent les réservoirs et les flux naturels. Les nombres et les flèches en rouge sont des contributions anthropiques. Ces flux sont des modifications du cycle du carbone depuis l'ère industrielle (post 1750). Les incertitudes à 90% de l'intervalle de confiance ont été reportées. (Ciais et al. 2013 ; IPCC, 2014)

I.2.1.2. En milieu marin

L'océan est le principal réservoir de carbone, stockant ~ 40 tératonnes de carbone, sous quatre formes chimiques, à savoir le carbone inorganique dissous (DIC), le carbone organique dissous (DOC), le carbone inorganique particulaire (PIC) et le carbone organique particulaire (POC) résultant en un cycle interne complexe. Les échanges avec l'atmosphère sont une composante clé du cycle du carbone marin et sont favorisés par la forte solubilité du CO₂ gazeux à la surface de l'océan. Le CO₂ dissous présent à la surface de l'océan peut retourner dans l'atmosphère ou subir diverses transformations qui contribuent à sa redistribution au sein de la colonne d'eau. Quatre pompes à carbone sont reconnues pour contrôler le cycle du carbone océanique : la pompe de solubilité, la pompe biologique, la pompe à carbonate et la pompe microbienne (*Volk et Hoffert, 1985 ; Sigman et Boyle, 2000 ; Jiao et al., 2010 ; Honjo et al., 2014*).

I.2.1.2.1 La pompe à solubilité

La pompe à solubilité commence par la dissolution du CO₂ atmosphérique dans l'eau de mer. En effet, l'excès de CO₂ dans l'atmosphère va conduire à un flux net de carbone vers l'océan à cause du déséquilibre induit entre la concentration atmosphérique et la concentration océanique. Le CO₂ gazeux atmosphérique se dissout et se transforme en carbone inorganique dissous (DIC) à la surface de l'océan. Le refroidissement des eaux de surface et la plus forte salinité de l'eau aux hautes latitudes augmentent leur capacité à solubiliser le CO₂ atmosphérique (le CO₂ est plus soluble à basse température et à forte salinité) tout en augmentant leur densité (*Figure I.2*). Ces eaux plongent alors en profondeur, emportant avec elles le DIC qui sera séquestré, c'est-à-dire non échangeable avec l'atmosphère, pendant des centaines à des milliers d'années, en raison du long temps de séjour des eaux profondes dans les océans (*Broecker et Peng, 1974 ; Broecker et al., 1979*).

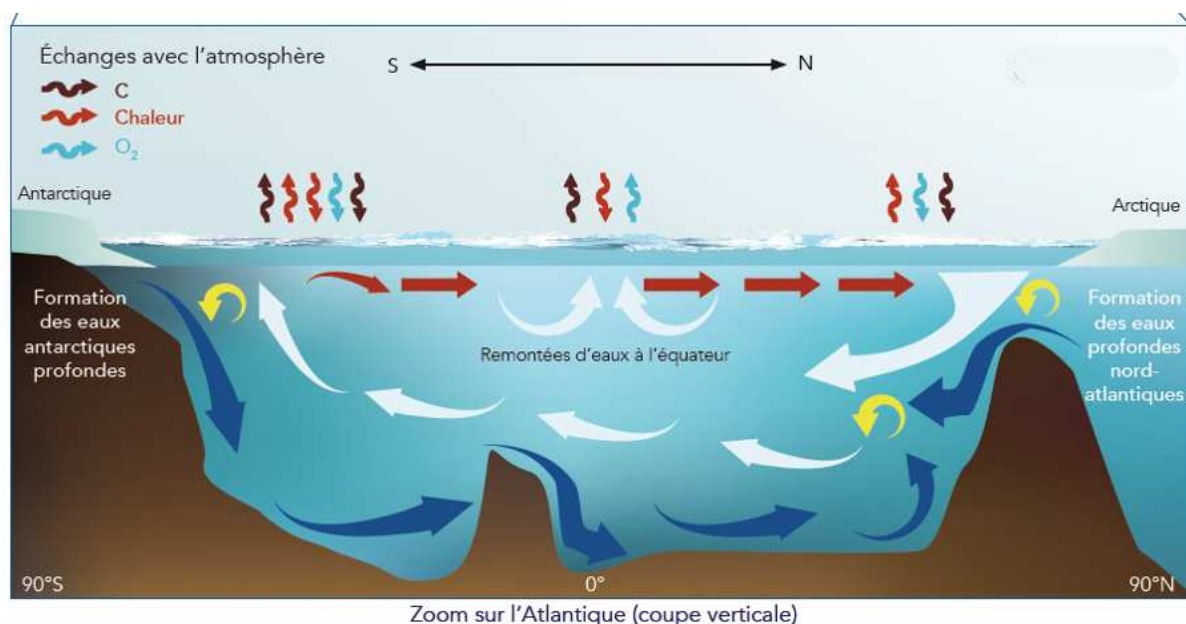


Figure I.2 : Schéma de la circulation océanique de l'Atlantique (modifié de ocean-climate.org).

I.2.1.2.2 La pompe à carbonate

Une autre partie importante du cycle du carbone implique la formation de carbone inorganique particulaire (PIC) via la précipitation de carbonate de calcium (CaCO_3) par des espèces de plancton spécifiques (Emilio *et al.*, 1993). Dans les océans, le carbone inorganique est principalement présent sous la forme d'ions bicarbonates (HCO_3^-). En effet, pour passer d'une forme gazeuse dans l'atmosphère (CO_2) à une forme ionique dans l'océan (ions carbonates CO_3^{2-}), une simple réaction chimique de dissolution se produit. Au contact de l'eau de mer (H_2O), le CO_2 forme de l'acide carbonique (H_2CO_3) qui, en se dissolvant, donnera des ions bicarbonates (HCO_3^-) et des protons (H^+). Les ions bicarbonates pourront être utilisés par les organismes marins tels que les coccolithophores, les foraminifères et les ptéropodes pour former leur structure calcaire en associant des ions calcium (Ca^{2+}) pour former du carbonate de calcium (CaCO_3) (Emilio *et al.*, 1993). Par la suite, la sédimentation des particules biominérales entraîne la séquestration du carbone en profondeur. En effet, le CaCO_3 (ou PIC) n'est pas biodégradable et coule, 50% de celui-ci se dissout dans les couches intermédiaires et profondes, le reste atteint l'océan profond où environ 20% est enfoui (Feely *et al.* 2004).

I.2.1.2.3 La pompe biologique

En 1934, Redfield remarque que la croissance, l'enfoncement et la reminéralisation du phytoplancton génèrent une différence de concentration de carbone entre les eaux de surface et les eaux profondes. Cette différence a été nommée « soft-tissue carbon pump » par Volk et

Hoffert (1985), mieux connue aujourd'hui sous le nom de pompe à carbone biologique. La pompe biologique est une suite de processus à médiation biologique. Dans les eaux de surface, les assemblages de phytoplancton prélèvent les nutriments et le DIC, puis les transforment lors de la photosynthèse pour produire du POC et du DOC. Cette fixation du carbone est définie comme la production primaire (PP). Le POC peut être transféré dans le réseau trophique via le broutage du phytoplancton par le zooplancton, puis vers les niveaux trophiques supérieurs. Chaque niveau trophique, via la respiration et son métabolisme, peut transformer une partie de ce POC en DOC et en DIC. Ainsi, au travers des interactions entre les différents maillons du réseau trophique et des différentes transformations qu'il subit, le carbone organique est stocké au sein des êtres vivants. En parallèle, via la sédimentation de particules denses excrétées (e.g. pelotes fécales du zooplancton) et d'organismes ne pouvant se maintenir dans les couches de surface ou morts, une partie du POC coule et est séquestrée en profondeur dans les océans (Figure I.3). Ce carbone séquestré en profondeur est ainsi perdu pour les eaux de surface, cette perte étant compensée par un pompage de CO₂ atmosphérique. Les migrations nyctémérales du zooplancton contribuent également à faciliter cet export en profondeur (Cavan *et al.*, 2019). Ainsi, entre 1 et 40% de la production primaire est exportée hors de la couche euphotique et s'atténue de façon exponentielle vers la base de la couche mésopélagique à environ 1000 m de profondeur. Seule une petite fraction du POC (< 0,1 PgC.an⁻¹) atteint les fonds marins, piégeant le carbone pendant des milliers à des centaines de milliers d'années (Sabine *et Feely*, 2007).

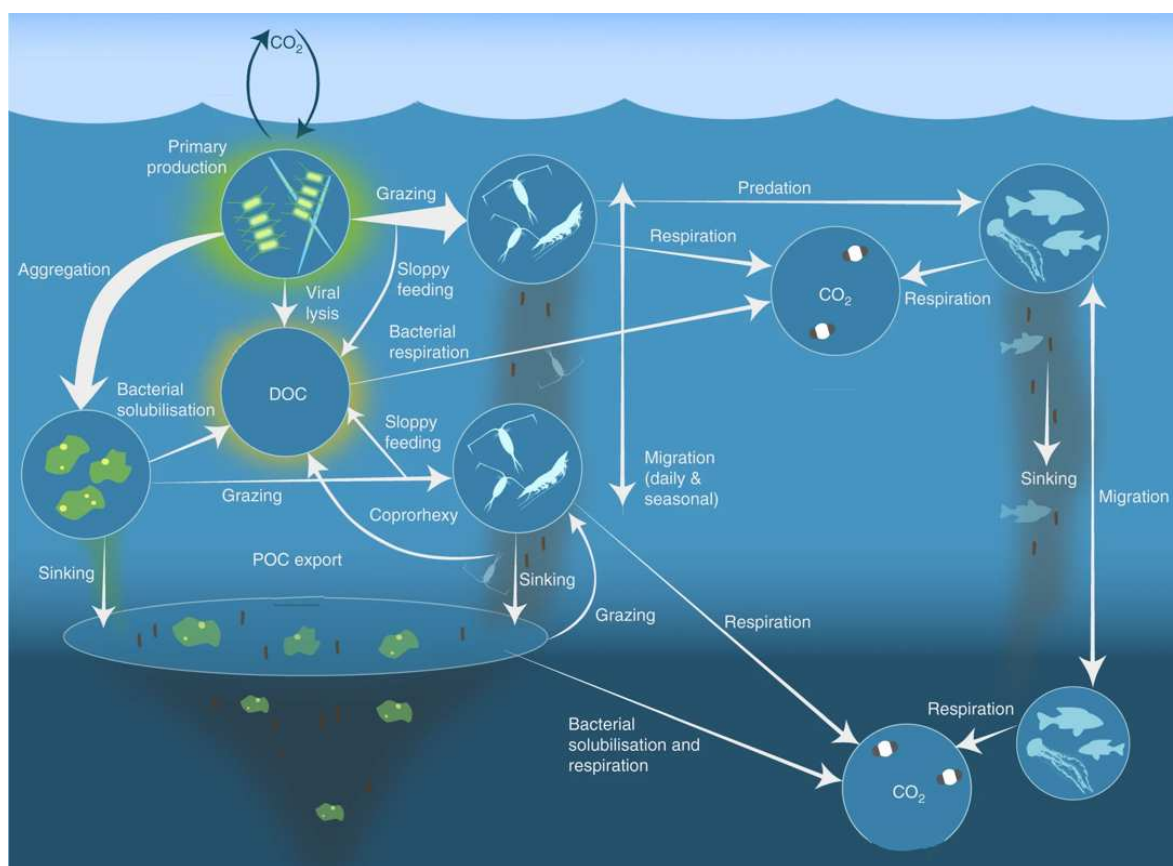


Figure I.3 : Représentation schématique de la pompe biologique du carbone dans l'océan (Cavan et al., 2019).

I.2.1.2.4 La pompe microbienne

Historiquement, l'export du POC était considéré comme le principal mécanisme de la pompe à carbone biologique, cependant, au cours des dernières décennies, le rôle du DOC dans les flux de carbone a été reconnu (Carlson et al., 1994). Jiao et al. (2010) ont introduit une composante conceptuelle à la pompe biologique de carbone qui permettrait d'expliquer l'accumulation de DOC dans l'océan : la pompe microbienne de carbone. En effet, le DOC produit dans la zone euphotique principalement par le phytoplancton est rapidement pris en charge par les procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées). Historiquement, la communauté scientifique considérait que ce DOC pouvait être respiré et retournait alors dans l'atmosphère sous forme de CO₂, ou pouvait être assimilé et transféré aux niveaux trophiques supérieurs via la boucle microbienne (Azam et al., 1983). Le concept de pompe microbienne de carbone propose qu'une fraction du DOC consommé par les procaryotes hétérotrophes est transformée et tend à s'accumuler dans l'océan (Carlson et al., 1994 ; Sohrin et Sempéré, 2005 ; Carlson et al., 2010 ; Santinelli et al., 2010 ; 2013 ; Hansell, 2013). Les procaryotes hétérotrophes ne sont alors plus

perçus seulement comme des consommateurs de DOC, mais également comme des producteurs de DOC réfractaire à la minéralisation. Tous ces processus reposent sur les interactions continues entre le DOC et les micro-organismes qui conduisent finalement à la production d'un énorme réservoir de DOC qui s'accumule pendant des milliers d'années, survivant à plusieurs cycles de renouvellement océanique avec un stock estimé à ~ 630 PgC (*Hansell, 2013*). Compte tenu de cette énorme réserve, tout changement dans le taux de dégradation du DOC pourrait affecter la concentration de CO₂ atmosphérique avec des conséquences sur le climat. Il a été démontré, à l'échelle mondiale, que l'oxydation nette de 1 % du pool de DOC libérerait dans l'atmosphère une quantité de CO₂ comparable à celle émise par la combustion anthropique d'énergie fossile en un an. Son importance devient encore plus préoccupante au vu des changements globaux que nous vivons actuellement.

Jusqu'à ce jour, et ce depuis les débuts de la période industrielle, l'océan a absorbé une part à peu près constante du CO₂ anthropique. Mais de nombreuses études suggèrent que plusieurs processus (chimie des carbonates, rétroaction du climat sur l'absorption du carbone, pompe biologique, pompe microbienne) pourraient amoindrir ou ralentir ce puits de carbone naturel. Parmi ces processus, les pompes biologique et microbienne sont les plus préoccupantes car leur devenir est difficile à prédire. Une estimation de l'effet des modifications des écosystèmes marins sur le puits océanique de carbone, même qualitative, reste encore hautement spéculative. Puisque les activités des pompes biologique et microbienne sont fortement liées à la production primaire et à la minéralisation de la matière organique dissoute, il est important de mieux comprendre et de tenir compte des effets de l'anthropisation sur ces processus.

1.2.2. La matière organique dissoute (DOM)

1.2.2.1. La DOM océanique : un élément fondamental du cycle global du carbone

La matière organique (OM) dans les océans est définie comme un mélange très complexe de composés organiques avec divers groupes fonctionnels ainsi que des éléments essentiels. Elle peut être divisée en deux catégories : les phases dissoute et particulaire. Il n'existe pas de séparation naturelle entre ces deux fractions, elles sont traditionnellement séparées sur des critères de taille (*Asmala et al., 2013*), une distinction opérationnelle visant à simplifier leur caractérisation. La matière organique particulaire (POM) est généralement définie comme la fraction retenue par un filtre de porosité 0,2 µm, tandis que la fraction qui passe à travers est définie comme la matière organique dissoute (DOM). La taille du continuum de la matière organique dans les milieux aquatiques est illustrée à la *Figure 1.4*. Dans les océans, les stocks

estimés de carbone issus de la DOM et de la POM sont respectivement de 662 Gt et 30 Gt (*Hansell et al., 2009*). Selon les analyses stœchiométriques, la DOM est composée principalement de carbone, cela signifie que la mesure de concentration en DOC est un proxy de la concentration en DOM. La DOM est également composée d'azote organique dissous (DON, 6,8%) et de phosphore organique dissous (DOP, 0,3%) (*Karl et Bjökman, 2015*). Elle peut être divisée en deux catégories : les phases dissoutes et particulaires.

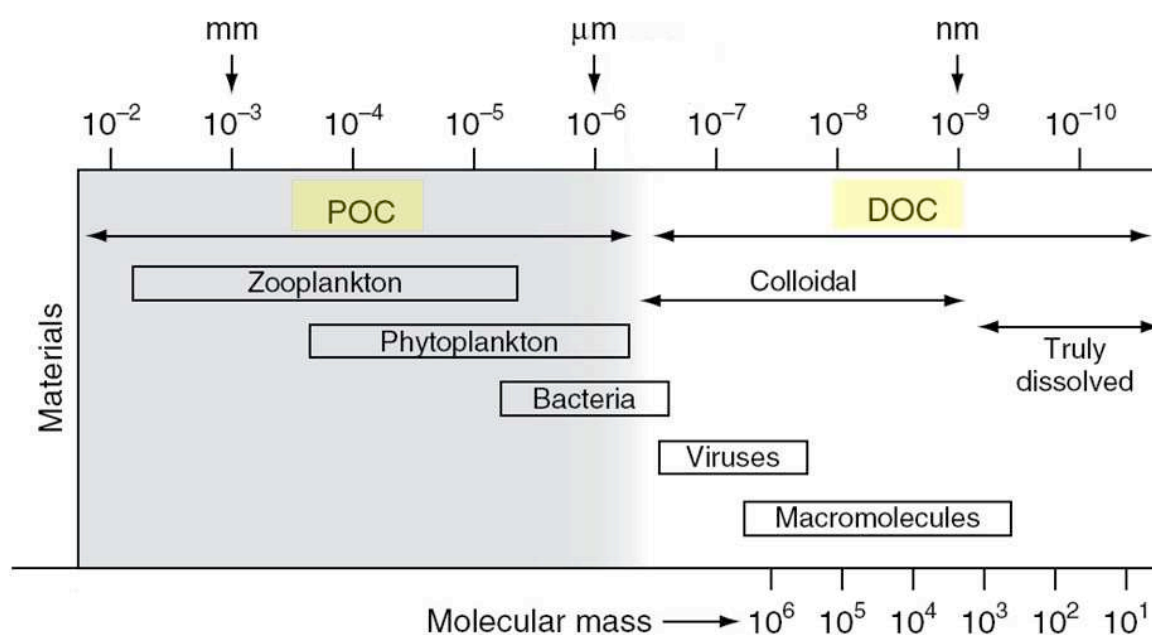


Figure I.4 : Taille du continuum de la matière organique, particulaire et dissoute, dans l'océan (*Verdugo et al., 2004*).

A la lumière de sa pertinence dans le cycle global du carbone et de son lien potentiel avec le changement climatique actuel (source de CO₂ atmosphérique), il est préoccupant que certaines questions les plus essentielles concernant le cycle de la DOM restent encore sans réponse. En effet, avant les années 2000, un manque de données fiables sur la DOM ne permettait pas de décrire correctement la distribution, les inventaires et les flux de DOC dans l'océan, ou encore sa contribution à l'écologie et à la biogéochimie dans la colonne d'eau. Depuis, les études ont révélé une variabilité temporelle et spatiale importante de la DOM (*Hansell et al., 2009* ; *Santinelli et al., 2015*).

I.2.2.2. Origine de la matière organique dissoute

Les concentrations en DOM sont relativement hétérogènes dans l'océan, variant de 60-80 μM dans les eaux de surface à ~ 40 μM dans les eaux profondes (*Carlson, 2002* ; *Hansell et al., 2009*). Elles peuvent atteindre des valeurs nettement plus élevées en milieu côtier à cause de

l'augmentation de la productivité du système et de la multiplicité de sources potentielles de DOM. Dans les océans, la DOM provient de trois sources majeures : les sources autochtones, allochtones et anthropiques (*McKnight et Aiken, 1998 ; Mostofa et al., 2009*). La majeure partie de la DOM dans les océans est d'origine autochtone liée à la production primaire réalisée par le phytoplancton, et dans une moindre mesure les macroalgues et herbiers marins (*Nagata, 2000*). Le phytoplancton excrète et exsude une part importante de la matière organique qu'il produit (2 à 50%) (*Thornton, 2014*). Les exsudats sont principalement constitués de polysaccharides, d'acides aminés, de peptides, d'acides organiques et de lipides. Les organismes phytoplanctoniques qui contribuent à la production primaire ne représentent qu'une petite fraction du carbone organique dans l'océan, mais ils sont capables de générer de grandes quantités de carbone organique chaque année (près de 50 PgC) (*Charlson et al., 1987*). Les autres sources de DOM autochtone sont le broutage, l'excrétion de pelotes fécales et la lyse virale des producteurs primaires qui libèrent leur contenu cellulaire (*Sempéré et al., 2000 ; Bertilsson et Jones, 2003 ; Jiao et al., 2010 ; Carlson et Hansell 2015*).

En milieu côtier, les apports allochtones par les fleuves, les eaux souterraines et les eaux de ruissellement superficielles sont également une source non négligeable de DOM (*Cauwet, 2002 ; Hudson et Reynolds, 2007*). Les principaux apports allochtones proviennent de la matière organique du sol et de la dégradation des plantes (*McKnight et al., 2001*). Les apports allochtones en zone côtière entraînent également un approvisionnement accru en nutriments inorganiques qui favorise la production phytoplanctonique autochtone, contribuant à la plus grande productivité des zones côtières comparée à celle des zones hauturières (*Figure I.5*).

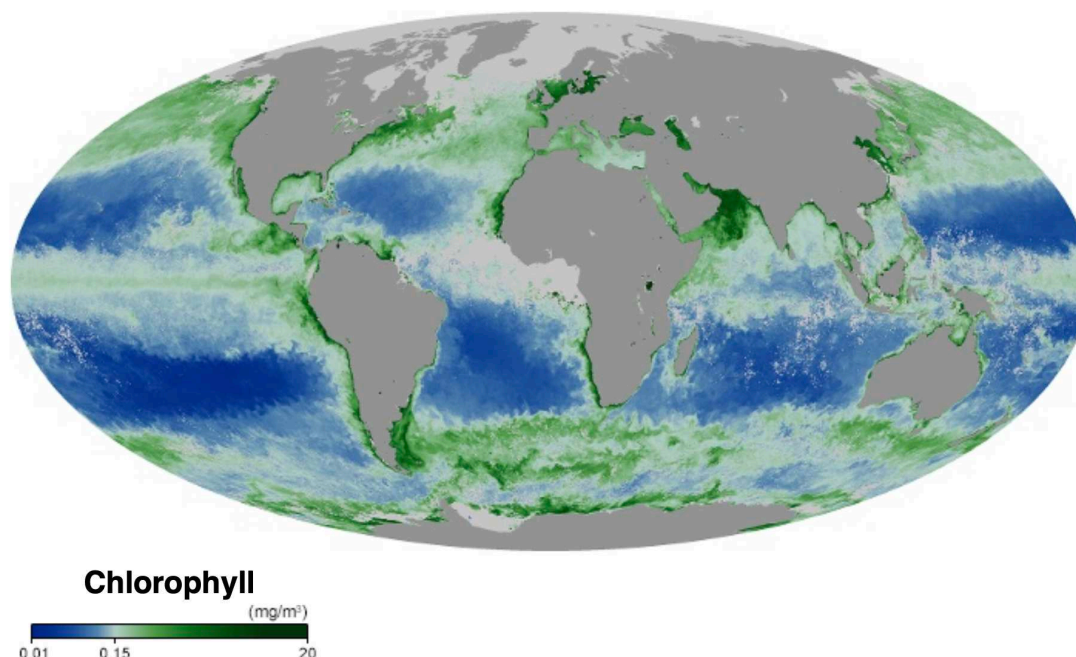


Figure 1.5 : Image satellite de la distribution de la chlorophylle a océanique mondiale en février 2022 (Nasa – earth observatory).

Aux sources naturelles s'ajoutent les sources anthropiques de DOM provenant principalement des effluents urbains, industriels et agricoles, des eaux de ruissellement (lixiviats de décharges, ruissellement urbain) ainsi que des apports directs par les activités maritimes (*Pernet-Coudrier et al., 2008 ; Mostofa et al., 2010*). Ces activités anthropiques libèrent un grand nombre de contaminants organiques tels que des phénols, des pesticides, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des produits pharmaceutiques (*Rawn et al., 2001 ; Meng et al., 2013 ; Mostofa et al., 2013 ; Parinos et al., 2013*). L'utilisation de ces polluants à travers le fonctionnement trophique est une voie importante de transfert des contaminants d'origine anthropique aux micro-organismes et aux niveaux supérieurs du réseau trophique (*Fu et al., 2010*). De plus, tout comme les apports allochtones, les apports anthropiques peuvent indirectement stimuler la production primaire.

Ainsi, toute matière organique possède une origine et une composition qui reflètent son environnement local, caractérisé par son exposition aux apports continentaux et aux activités humaines. Les processus inhérents à un milieu donnent à sa matière organique, par des apports et des mécanismes spécifiques, des caractéristiques particulières responsables de sa réactivité unique. L'étude de la DOM a donc nécessité la mise en place d'outils puissants et diversifiés permettant sa caractérisation.

I.2.2.3. Processus de transformation et d'élimination de la DOM dans les océans

La distribution mondiale et le devenir de la DOM dans l'océan sont très variés et dépendent des processus d'élimination biotiques et abiotiques.

I.2.2.3.1 Transformations de la DOM par les processus photochimiques

Les processus photochimiques ont un impact significatif sur le cycle de la DOM dans les milieux aquatiques et affectent ainsi la structure et la fonction des écosystèmes. La photominéralisation et les phototransformations éliminent directement et modifient structurellement la DOM, influençant son utilisation biologique et son devenir (*Mopper et Kieber, 2002*). L'origine et la composition chimique de la DOM ont un impact important sur sa photoréactivité et sa bioréactivité ultérieure (*Kieber et al., 1990 ; Mopper et al., 1991 ; Miller et Zepp, 1995 ; Bertilsson et Tranvik, 2000*). Un effet positif net de l'irradiation sur la bioréactivité a été décrit pour les DOM provenant de systèmes aquatiques avec un apport important de matière terrigène (*Moran et Zepp, 1997*) et de l'océan profond (*Mopper et al., 1991 ; Benner et Biddanda, 1998 ; Obernosterer et al. 1999*). Les étapes de transformation abiotiques contribuent également à la formation de structures moléculaires récalcitrantes. Il est en effet prouvé que les réactions induites par la lumière à la surface de la mer modifient la structure moléculaire des biomolécules de telle sorte qu'elles deviennent inaccessibles aux micro-organismes (*Benner et Biddanda, 1998 ; Obernosterer et al., 1999 ; Tranvik et Bertilsson, 2001*).

I.2.2.3.2 Transformation de la DOM par les procaryotes hétérotrophes

Bien que les processus abiotiques, principalement l'oxydation photochimique de la DOM (*Mopper et Kieber, 2002*), puissent représenter un mécanisme d'élimination et de transformation important, le principal processus d'élimination est la consommation par les procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées). En effet, la quantité de DOM assimilée par les procaryotes hétérotrophes représenterait 50% de la production primaire océanique (*Williams, 2000*).

Les procaryotes regroupent les domaines des bactéries et des archées. Jusque dans les années 1990, ces deux groupes d'organismes unicellulaires « sans noyau » étaient regroupés dans ce que les écologistes microbiens ont reconnu être une « boîte noire ». En effet, l'étude de ces microorganismes a pendant longtemps été négligée car leur taille microscopique était souvent à l'origine d'obstacles techniques. Toutefois, les avancées récentes dans le domaine de la

biologie moléculaire, la génétique et la physiologie placent désormais l'étude des microorganismes à la pointe de la recherche moderne. Ces techniques ont permis de dévoiler des diversités taxonomiques et fonctionnelles très riches, de nombreuses interactions entre les microorganismes et des capacités d'adaptation surprenantes acquises au cours de l'évolution (*Kirchman, 2008*).

Les procaryotes remplissent des fonctions importantes dans les écosystèmes car ils sont impliqués dans tous les cycles biogéochimiques (*Falkowski et al., 2008*). Plusieurs processus biogéochimiques clés (par exemple, la nitrification, la dénitrification ou la fixation de l'azote) sont exclusivement médiés par les procaryotes (*Galloway et al., 2004*). De plus, les procaryotes contribuent également à fournir des services écosystémiques essentiels comme la régulation du climat via leur impact sur le stockage du carbone. De plus, les procaryotes sont partout et en grand nombre. La densité des procaryotes 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*). De nombreuses estimations de la densité cellulaire, du volume et de la teneur en carbone indiquent que les procaryotes sont omniprésents et constituent l'essentiel de la biomasse dans les eaux marines (*Whitman et al., 1998*). Les procaryotes présentent également une très grande diversité fonctionnelle, leur permettant notamment d'utiliser différentes sources de carbone pour leur croissance.

Les procaryotes hétérotrophes sont les principaux décomposeurs de la matière organique. Ce sont les principaux consommateurs de la DOM, canalisant le carbone organique libéré par le phytoplancton et les macroorganismes dans le réseau trophique à travers la boucle microbienne qui convertit jusqu'à 40 PgC dans la biomasse chaque année (*Azam et al., 1983 ; Azam et Malfatti, 2007 ; Dittmar et Stubbins, 2014*). Les procaryotes hétérotrophes sont d'autant plus importants qu'ils interviennent aussi bien en surface (*Carlson et al., 1994 ; Cho et Azam, 1990*) que dans les zones méso- et bathypélagiques (*Aristegui et al., 2009 ; Carlson et al., 2010*). La dynamique des procaryotes hétérotrophes dans le fonctionnement et l'assemblage des communautés est donc essentielle pour les processus et le fonctionnement de l'écosystème marin ainsi que pour le cycle mondial du carbone.

La production de biomasse et la minéralisation caractérisent deux processus essentiels du flux de carbone à travers les procaryotes hétérotrophes : la production procaryotique (PP) et la respiration procaryotique (PR). La balance entre ces deux processus conditionne l'efficacité (ou rendement) de croissance procaryotique (historiquement considérée comme essentiellement bactérienne et appelée « Bacterial Growth Efficiency », BGE). En effet, si la PP est moins importante que la PR alors la BGE décroît et le système est un moindre puits, voire une source

de CO₂. Par définition, la BGE est la quantité de nouvelle biomasse procaryote synthétisée par unité de substrat assimilée (*del Giorgio et Cole, 1998*). Elle est définie par la formule suivante : $BGE = (PP)/(PP + PR)$. Chez les procaryotes hétérotrophes, la distribution des flux de carbone entre les processus anaboliques et cataboliques conditionne la BGE. Un substrat organique est utilisé par la cellule pour, d'une part, réaliser des réactions cataboliques générant de l'ATP et, d'autre part, effectuer des réactions anaboliques pour synthétiser de la biomasse (*Dawes, 1985*). Ainsi, le catabolisme aboutit à la minéralisation du carbone organique sous la forme de CO₂ alors que l'anabolisme aboutit à son intégration à la biomasse. Les estimations de BGE pour les procaryotes planctoniques marines en milieu naturel vont de < 0,05 à 0,6 avec une valeur moyenne de 0,3. Plusieurs processus déterminent la BGE, chacun pouvant répondre à un ensemble différent de facteurs de contrôle. La teneur en carbone du substrat organique et l'énergie extractible de sa dégradation peuvent déterminer s'il sera préférentiellement catabolisé ou incorporé dans les composants structuraux. Une faible BGE peut ainsi résulter d'une mauvaise qualité du substrat (dépendante de sa composition moléculaire), même lorsque la ressource est fournie en quantités qui dépassent de loin la demande biosynthétique (*Westerhoff et al., 1983*). Les dépenses énergétiques nécessaires à la prise en charge de ressources dans l'environnement et l'établissement de réserves intracellulaires participent également à l'équilibre entre anabolisme et catabolisme (*del Giorgio et Cole, 1998*). La BGE est donc fortement influencée par la biodisponibilité des ressources dans l'environnement proche des procaryotes hétérotrophes. Dans l'océan, la variabilité de la biodisponibilité de la DOM dans l'espace et le temps a permis le développement en réponse de différentes stratégies de croissance individuelles et d'adaptations métaboliques et génomiques parmi les procaryotes hétérotrophes. Ces réponses microbiennes à court ou long terme influencent le devenir du carbone via des variations de BGE.

I.2.2.4. Les stratégies écologiques

La structure des communautés de procaryotes reflète les contraintes environnementales auxquelles elles sont soumises. Ces contraintes sont regroupées en trois grandes catégories : la prédation par des protistes et la lyse virale représentent des pressions descendantes ou « top-down », la disponibilité en ressources nutritives contrôle le développement et correspond à une pression ascendante ou « bottom-up », et les interactions entre procaryotes considérées comme une voie latérale de sélection appelée « sideways » (*Fuhrman et Hagström, 2008*). Ces interactions peuvent être des relations d'exclusion mutuelle ou de coopération interspécifique

pour l'utilisation de substrats comme les relations syntrophiques par exemple. Cela peut également relever de la compétition entre organismes pour un même substrat. La combinaison de ces trois catégories de pressions sélectionne des espèces bactériennes aux stratégies de croissance différentes, maximisant leur aptitude à la survie selon les conditions de l'environnement. A l'instar des organismes dits « supérieurs », deux types fondamentaux de stratégies de croissance ont été distingués chez les bactéries : les stratégies r et K. Andrews et Harris (1986) ont fourni un cadre pour appliquer à la dynamique des communautés microbiennes les termes de sélection r et K issus de la théorie écologique populaire développée par MacArthur et Wilson (1967). Selon ces travaux, il est proposé que lors de la colonisation spontanée d'un nouvel environnement, les communautés opportunistes se développent rapidement en bénéficiant d'une très faible compétition et en investissant l'énergie qu'elles tirent des ressources présentes dans leur environnement principalement dans la reproduction. Ces organismes sont capables de se développer rapidement (fort taux de croissance) en utilisant une large gamme de substrats, parfois complexes. Ils sont donc capables de produire beaucoup de biomasse en peu de temps (court temps de génération). Ces microorganismes opportunistes sont qualifiés de stratégies r. Cependant, ces stades pionniers sont instables car ils sont très vite soumis aux pressions top-down et bottom-up. En effet, grâce à leur capacité enzymatique importante, les bactéries à stratégie r vont avoir tendance à épuiser rapidement les ressources. À cela s'ajoute l'influence de la pression top-down, à savoir le broutage par les protistes et la lyse virale, à laquelle les stratégies r sont très sensibles notamment en raison de leur grande taille (Cram *et al.*, 2016). Le déclin des bactéries à stratégie r est donc rapidement observé au point de devenir rares dans la communauté, et elles sont progressivement remplacées par des espèces à stratégie K. Ces stratégies K sont plus compétitifs lorsque la disponibilité des ressources diminue car ils sont très spécialisés pour l'utilisation de substances spécifiques, même en faible concentration, et ils sont plus petits donc moins sensibles à la prédation et à la lyse virale. Il a également montré que les stratégies K utilisent principalement l'énergie des ressources qu'elles exploitent pour des fonctions de maintenance, ce qui leur confère un taux de croissance plus lent et une productivité moindre par rapport aux stratégies r (Pedler *et al.*, 2014). Ainsi, les stratégies r et K, telles qu'elles sont généralement discutées en écologie, sont considérées comme faisant partie d'une succession temporelle dans laquelle une communauté microbienne se développe à partir d'un stade pionnier très dynamique, dominé par des stratégies r et représenté par des populations clairsemées et une disponibilité immédiate des ressources. Cette succession aboutit à un stade mature, marqué par un surpeuplement et une compétition intense pour les ressources menant à une dominance de stratégies K dans la communauté.

Un changement dans la stratégie trophique dominante peut également être observé lors de phénomènes plus courants que la colonisation d'un nouvel environnement. Par exemple, Navarro et al. (2023) ont montré qu'un apport continental brutal dans les zones côtières oligotrophes engendrent une baisse de diversité et sélectionnent seulement quelques groupes opportunistes. Cram et al. (2016) ont également montré qu'en diminuant la pression top-down, des unités taxonomiques normalement rares se développent rapidement et dominent la communauté. Ainsi, un changement dans les contraintes environnementales, comme un apport massif de matière organique ou une diminution de la pression top-down par effet de dilution, engendre une forte sélection de quelques taxa, ce qui suggère un changement dans la stratégie trophique dominante dans la communauté avec le développement rapide des stratégies r naturellement rares (Logue et al., 2016).

Les procaryotes hétérotrophes possèdent des taux de croissance très différents selon la stratégie de croissance adoptée. Le taux de croissance moyen des procaryotes hétérotrophes dans les eaux océaniques a été estimé à $0,09 \pm 0,12 \text{ jour}^{-1}$ (Kirchman, 2016). Pirt (1965) prédit que des taux de croissance lents seraient associés à une croissance inefficace. Cependant, dans la littérature, aucune relation significative entre le taux de croissance et l'efficacité de croissance dans les assemblages naturels de procaryotes hétérotrophes n'a été démontré (Schweitzer et Simon, 1995 ; del Giorgio et Cole, 1998). Seul le taux d'enlèvement du carbone est affecté par ces stratégies de croissance individuelles. Pedler et al. (2014) ont, par exemple, démontré qu'une souche, sans pression compétitive ou de broutage, pouvait éliminer la même quantité de DOM qu'une communauté naturelle et diversifiée.

Au-delà de la sélection à court terme de différentes stratégies de croissance, l'adaptation à long terme à la disponibilité en ressources conditionne également l'efficacité de croissance bactérienne. Une fois la stabilité d'une communauté mature atteinte, les écologues microbiens ont distingué deux stratégies d'utilisation des ressources, héritées de l'évolution adaptative des microorganismes : l'oligotrophie, *i.e.* l'adaptation à un environnement pauvre en ressources nutritives, et la copiotrophie, *i.e.* l'adaptation à une relative profusion de ressources nutritives (Koch, 2001 ; Lauro et al, 2009 ; Li et al, 2021). Ces deux stratégies liées à l'histoire de vie sont véritablement considérées comme des adaptations à plus long terme des espèces microbiennes. L'évolution des espèces détermine comment elles répartissent l'énergie disponible entre différentes activités telles que la croissance, la maintenance cellulaire, ou la résistance au stress (Stearns, 1977 ; Ferenci, 2016). Les copiotrophes ont des besoins nutritifs élevés et affichent des taux de croissance importants tandis que les oligotrophes présentent des

taux de croissance plus lents et sont adaptées à une faible disponibilité en ressources (*Fierer et al., 2007*). La comparaison entre deux espèces avec une stratégie différente a montré des caractéristiques génomiques discriminantes. D'après de nombreuses études, ces différences physiologiques sont en grande partie dues à la taille du génome (*Konstantinidis et Tiedje, 2003 ; Biers et al., 2009 ; Saifuddin et al., 2019*). En effet, pour s'adapter à un milieu pauvre, par des processus évolutifs et adaptatifs, les taxa oligotrophes vont avoir tendance à perdre des gènes qui nécessitent une consommation d'énergie inutile. Ces processus ont entraîné l'apparition de génomes très petits, sans aucun gaspillage, adaptés à un milieu très peu variable et pauvre en ressources nutritives (*Biers et al., 2009*). D'après Klappenbach et al. (2000) la multiplicité des gènes dans une bactérie fournit un indicateur génétique de sa stratégie écologique générale pour l'exploitation des ressources. Lauro et al. (2009) ont démontré que les taxa copiotrophes ont généralement de gros génomes comparés aux taxa oligotrophes. Un nombre élevé de gènes permet à une cellule de répondre rapidement aux améliorations transitoires des conditions environnementales (*Klappenbach et al., 2000*) et d'accéder à une plus grande variété de substrats (*Saifuddin et al., 2019*). Cela peut être avantageux, en particulier dans les environnements qui reçoivent une quantité mais surtout une diversité importante de ressources. Les bactéries copiotrophes marines possèdent une grande variété de voies cataboliques. Elles produisent des enzymes extracellulaires, comme des protéases, pour pouvoir dégrader les biopolymères en soluté (*Li et al., 2021*). Les taxa copiotrophes ont donc la capacité de réaliser un grand nombre de réactions de transport associées à l'absorption du carbone (*Lauro et al., 2009*). En revanche, les bactéries oligotrophes sont oxybiontiques car, par manque de ressources nutritives, elles réalisent l'oxydation complète d'un composé (*Lauro et al., 2009*). Pour dégrader le substrat, contrairement aux copiotrophes qui utilisent des enzymes extracellulaires, ces bactéries utilisent des acides aminés hydrolysants (*Li et al., 2021 ; Lauro et al., 2009*).

Ces différentes stratégies écologiques sont donc des adaptations aux ressources présentes dans leur environnement qui leur permettent d'utiliser le pool de DOM spécifique à leur environnement. Cependant, une situation paradoxale existe : le bactérioplancton qui décompose la matière organique est entouré d'un énorme réservoir de matière organique qui semble rester intact pendant des milliers d'années. En effet, alors que 50% du carbone fixé par le phytoplancton (*Ducklow et Carlson, 1992 ; Williams, 2000*) ou plus (*del Giorgio et Cole, 1998*) est acheminé par la DOM et transformé par le bactérioplancton, une fraction de la production de DOM s'accumule dans les eaux de surface et résiste aux attaques microbiennes rapides. Hansell et Carlson (1998) estiment que 1,2 GtC.an⁻¹ ou 17 % de la nouvelle production

mondiale échappent à l'utilisation microbienne rapide, s'accumulent dans les eaux de surface et sont disponibles pour l'export vers les profondeurs de l'océan. La DOM n'est pas piégée dans un environnement inhabitable comme les autres grands réservoirs de carbone organique sur Terre. En effet, l'accumulation de DOM sur de grandes échelles spatiales et temporelles se produit dans des conditions environnementales favorables à la vie. Si les bactéries sont si efficaces pour décomposer la DOM fraîchement produite, pourquoi tant de DOM s'accumule dans l'océan ? Pour comprendre ce paradoxe, il est nécessaire de passer en revue les facteurs et les processus qui déterminent la prise en charge de la DOM par les communautés microbiennes et son devenir.

1.2.2.5. Labilité de la DOM comme clef de son devenir en milieu marin

La diversité de sources et de transformation que subit la DOM dans la colonne d'eau entraîne une grande variabilité de composition qui peut influencer sa biodisponibilité pour les microorganismes hétérotrophes. Le temps entre la production de DOM et sa transformation est appelé « temps de vie » et est lié à la labilité des composés, dans un environnement et des conditions écologiques spécifiques. Dans sa revue, Hansell (2013) a divisé le pool de DOM en cinq fractions avec des temps de vie différents. Il existe tout d'abord une fraction labile (LDOC) avec un temps de vie allant de quelques minutes à plusieurs jours. En raison de son élimination rapide, LDOC ne s'accumule pas et représente un petit stock global ($< 0,2$ PgC). Ensuite, une fraction semi-labile (SLDOC) est définie par un temps de vie compris entre une semaine et $\sim 1,5$ ans selon le type d'écosystème. Avec un temps de persistance plus élevé, cette SLDOC représente un stock de 6 ± 2 PgC. Son accumulation au-dessus de la pycnocline saisonnière et son exportation verticale ($1,5$ PgC.an⁻¹) en font la fraction la plus importante contribuant à la pompe biologique (Hansell *et al.*, 2012). Une fraction semi-réfractaire (SRDOC) est définie par un temps de vie de ~ 20 ans. Si son stock est important 14 ± 2 PgC, son transport vertical est faible ($\sim 0,34$ PgC.an⁻¹) car elle correspond principalement à une DOM accumulée en profondeur des océans. Sa contribution à la séquestration du carbone à long terme est importante. Une fraction réfractaire (RDOC) avec un stock global d'environ 630 PgC qui dépasse le renversement global de l'océan d'environ 16 000 ans. RDOC est visible lorsque SLDOC et SRDOC sont absents, généralement à une profondeur > 1000 m. Enfin, une fraction ultra-réfractaire (URDOC) avec un inventaire > 2 PgC et un temps de rotation de ~ 40000 ans. L'URDOC ne peut pas être observée directement ni distinguée des autres fractions (LDOC, SLDOC, SRDOC et RDOC) dans les profils verticaux de DOC. Sa présence peut être déduite

des analyses de radiocarbone et de composition moléculaire. Des études antérieures ont démontré que le carbone aromatique polycycliques (tel que le carbone noir thermogénique) sont des composants du pool URDOC (*Dittmar et Koch 2006 ; Dittmar et Paeng 2009*) et qu'ils ont des âges radiocarbone supérieurs à ceux de la DOM environnante.

Bien que la séparation du pool de DOC en fractions distinctes se soit avérée utile dans les études antérieures, la DOM présente un continuum de labilité biologique (*Gonsior et al., 2022*). Sa persistance dans l'océan dépend non seulement des caractéristiques des molécules qui la composent mais également de leur interaction avec la communauté microbienne, dans un environnement aux conditions spécifiques (*Nelson et Wear, 2014*). Des études récentes ont souligné que la labilité de la DOM est déterminée par une série de propriétés du système (chimique, biologique, environnementale et écosystémique) et peut changer dans le temps et dans l'espace (*Repeta, 2021*). Ainsi, la labilité biologique peut être difficile à définir. Au cours des dernières décennies, de nombreuses hypothèses ont tenté de fournir un cadre conceptuel pour comprendre les mécanismes régissant la formation, la minéralisation et la persistance de la DOM dans l'océan. Ci-après, certaines des théories les plus récentes concernant la labilité de la DOM dans les océans sont résumées :

- Le modèle du continuum taille-réactivité relie la taille, la réactivité et la complexité moléculaire de la DOM (*Benner et Amon, 2015*). Selon ce modèle, les classes de matière organique de plus grande taille sont plus biodisponibles et plus rapidement minéralisées par les microorganismes que les classes de plus petite taille. Des études sur la composition chimique et la teneur en radiocarbone de la matière organique marine ont en outre indiqué que la complexité et l'âge de la matière organique augmentent avec la diminution de la taille moléculaire (*Walker et al., 2011 ; Benner et Amon, 2015*). Les processus de biodégradation semblent façonner la distribution de la taille de la matière organique et la nature des petites molécules dissoutes qui persistent dans l'océan.
- L'hypothèse de dilution suggère que la majeure partie de la DOM dans l'océan, même celle que l'on croit réfractaire, est en fait labile mais elle est présente à une concentration si faible que l'investissement énergétique pour son absorption n'est pas bénéfique pour les procaryotes hétérotrophes (*Arrieta et al., 2015*). Certains soutiennent l'hypothèse que la concentration en DOM contrôle sa prise en charge par les communautés microbiennes (*Jiao et al., 2011 ; Dittmar, 2015*). Plus récemment, Shen et Benner (*2020*) et Lennartz et Dittmar (*2022*) ont débattu sur le rôle des deux mécanismes concurrents, mais non mutuellement exclusifs, de récalcitrance structurelle et de limitation de la concentration en substrat.

Une variété de modèles mathématiques et d'observations expérimentales ont conduit à la formulation de deux concepts pour expliquer la persistance de la DOM :

- La récalcitrance intrinsèque : selon ce concept, la persistance à long terme de la DOM dans l'océan est due à ses propriétés structurelles qui empêchent son élimination rapide, permettant ainsi son accumulation dans la colonne d'eau (*Amon et al., 2001*). La récalcitrance intrinsèque est liée à la synthèse directe de molécules récalcitrantes par les microorganismes (qui ne consomment que du labile), couplée à des processus abiotiques comme la photodégradation. Une preuve de cette hypothèse est que les procaryotes hétérotrophes préfèrent un certain substrat et transforment de simples biomolécules libérées par le phytoplancton en DOM complexe récalcitrante (*Moran et al., 2016*).
- La récalcitrance émergente : le concept de récalcitrance émergente repose sur le principe que tous les types de DOM (*i.e.* LDOC, SLDOC, SRDOC, RDOC, URDOC) sont pris en charge continuellement par les microorganismes, à différentes échelles de temps. La dégradation diminue à mesure que la concentration diminue et la diversité moléculaire augmente. Selon cette hypothèse, la récalcitrance émerge au niveau de l'écosystème plutôt que d'être une caractéristique intrinsèque des molécules du pool de DOM (*Mentges et al., 2019 ; 2020*).

La récalcitrance intrinsèque et émergente sont cohérentes avec les observations sur le terrain, cependant, le mécanisme qui prévaut pour déterminer la longévité de la DOM est inconnu (*Dittmar et al., 2021*).

- L'écologie des molécules : une idée récente et globale considère la complexité du système et propose le concept d'écologie des molécules (*Dittmar et al., 2021*). Ce nouveau concept met en évidence l'importance des interactions, dans un contexte environnemental, des organismes vivant comme pour la récalcitrance émergente mais aussi des conditions environnementales non vivant. De ces interactions, des propriétés que les acteurs individuels n'ont pas en tant qu'individus, émergent en tant que propriétés du système.

D'après l'ensemble de ces hypothèses il est clair que la caractérisation de la DOM nécessite un croisement entre différentes disciplines scientifiques : la chimie, la physique et la biologie. L'étude de la DOM seule ne permet pas de comprendre son devenir à travers la pompe microbienne. Il est essentiel d'étudier également les microorganismes qui l'utilisent pour comprendre les processus de transformation et indirectement l'impact qu'un changement dans le pool de DOM peut provoquer sur le cycle du carbone.

I.2.3. Les facteurs contrôlant la prise en charge de la DOM par les procaryotes hétérotrophes

I.2.3.1. La limitation par les propriétés des composés organiques

Dans l'océan profond, les micro-organismes hétérotrophes peuvent être limités par la qualité de la matière organique, tout en étant entourés d'un énorme stock de carbone organique. Cette apparente contradiction s'explique généralement par une stabilité intrinsèque des DOM réfractaires (*Jiao et al., 2011*). L'évolution a doté les organismes d'un nombre important de voies enzymatiques pour décomposer les molécules organiques. Cependant, la dégradation de ces molécules demande des conditions favorables rares. Si pour une raison quelconque ces conditions ne sont pas réunies, ces structures moléculaires ne seront pas dégradées et s'accumuleront dans l'environnement.

La DOM subit de nombreuses transformations dans le milieu qui influent sur sa qualité et sa disponibilité pour les communautés microbiennes. Keil et Kirchman (*1994*) ont observé que les protéines hautement labiles peuvent être préservées de la décomposition bactérienne. Ils ont proposé l'agrégation réversible des molécules comme mécanisme de protection. La DOM est riche en petites molécules amphiphiles qui ont le potentiel de former des micelles et des revêtements hydrophobes résistants à l'hydrolyse autour d'autres composés polaires (*Dittmar et Kattner, 2003*). Ce mécanisme peut protéger de la dégradation bactérienne, au moins temporairement, certains groupes de composés dans l'océan.

Outre les divers mécanismes de transformation de la DOM qui peuvent exister et modifier sa qualité, la diversité des composés qui la compose peut également exercer une influence sur sa biodisponibilité. Une cellule microbienne ne peut exprimer qu'un nombre limité de protéines de transport et de voies cataboliques, et ne peut donc traiter qu'un nombre limité de substrats différents. Il existe des preuves expérimentales que la limitation du substrat provoque l'expression simultanée de nombreux systèmes d'enzymes cataboliques, même si les sources de carbone appropriées sont absentes, préparant les cellules à utiliser immédiatement les substrats s'ils deviennent disponibles (*Kovarova-Kovar et Egli, 1998*). Cependant, il est probable que la DOM soit composée de millions de composés différents (*Dittmar et Stubbins, 2014 ; Gonsior et al., 2011 ; Hertkorn et al., 2013 ; Koch et al., 2005*). La concentration des composés individuels est extrêmement faible. En conséquence, la prise en charge des composés individuels de la DOM pourrait être contrôlée par leur concentration. Cependant, tant que le nombre de composés constituant la DOM et leurs concentrations sont inconnus, le lien entre la

décomposition observée de la DOM et la concentration ses différents composés reste hypothétique. Bien qu'entièrement spéculative à ce stade, l'hypothèse de la diversité moléculaire offre une vision différente de la persistance de la matière organique dans l'océan. Une dilution extrême du substrat pourrait fournir une explication mécanistique de la persistance de la DOM dans l'océan et également une réponse à la question de savoir pourquoi la DOM est finalement décomposée au cours des millénaires et non accumulée à l'infini. Le concept de dilution extrême du substrat implique également que la plupart des molécules organiques dissoutes sont dégradables lorsqu'elles sont à une concentration suffisamment élevée. Les taux de dégradation seraient couplés au taux de production, car les composés qui sont produits en forte quantité rencontrent des cellules plus fréquemment que les composés rares. En conséquence, la DOM et ses constituants individuels pourraient se trouver dans un état dynamique stable, où les entrées et les sorties seraient équilibrées.

I.2.3.2. La limitation par la stœchiométrie

Ce n'est pas toujours la concentration de carbone organique dissous qui est limitante pour les bactéries hétérotrophes. Les cellules vivantes dépendent de la disponibilité d'un certain ensemble d'éléments chimiques qui sont absolument essentiels à leur développement. Malgré l'énorme versatilité des micro-organismes et leur remarquable capacité à effectuer des transformations moléculaires, les micro-organismes sont impuissants face à la limitation par les nutriments (*Merchant et Helmann, 2012*). Les bactéries régulent le catabolisme de la matière organique de façon à atteindre une stœchiométrie intracellulaire stable (*del Giorgio et Cole, 1998*). De ce fait, le rendement de croissance est négativement relié au rapport C/N et C/P de la matière organique (*Goldman et al., 1987 ; Kroer, 1993 ; Vallino et al., 1996*). Dans les régions les plus appauvries en nutriments inorganiques de la partie supérieure de l'océan, les micro-organismes photoautotrophes ont réduit les concentrations de nutriments à des niveaux extrêmement bas, et il y a peu d'apport de nouveaux nutriments provenant des couches profondes de l'océan, des continents ou de l'atmosphère (*Moore et al., 2013*). En conséquence, la production hétérotrophe et la consommation de substrats organiques peuvent être entravées par le manque de nutriments essentiels dans l'océan oligotrophe (*Currie et Kalf, 1984 ; Wheeler et Kirchman, 1986 ; Kirchman, 1994*).

La limitation potentielle des procaryotes hétérotrophes par le carbone, l'azote et le phosphore est généralement testée par des expériences d'enrichissement en phosphate, nitrate et/ou ammonium, et glucose ajoutés seuls et/ou de manière combinée. Selon la situation

géographique, les éléments limitants peuvent varier (*Torréton et al., 2000 ; Carlson et Ducklow, 1996*). Le système probablement le mieux étudié dans ce contexte est la mer Méditerranée oligotrophe où la faible disponibilité en phosphate limite la croissance du phytoplancton et des bactéries hétérotrophes (*Kritzberg et al., 2010 ; Thingstad et al., 1998 ; Zohary et al., 2005*). Pour la mer Méditerranée, plusieurs expériences ont démontré de manière impressionnante qu'un substrat organique très labile, comme le glucose, ne peut pas être utilisé par les micro-organismes hétérotrophes en raison du manque de phosphate. Dans des expériences *in situ* à grande échelle dans le gyre oligotrophe de Chypre (mer Méditerranée orientale), les ajouts de phosphate ont provoqué des augmentations significatives de la production bactérienne (*Thingstad et al., 2005*). De même, l'ajout expérimental de phosphate aux eaux de surface du nord-ouest de la mer Méditerranée a fortement augmenté la production bactérienne (*Tanaka et al., 2009*). Dans cette dernière expérience, une communauté bactérienne hétérotrophe s'est développée sur la DOM naturelle quelques jours après l'ajout de phosphate. L'ajout de glucose seul, en revanche, n'a pas stimulé la production bactérienne. Ces expériences (*Tanaka et al., 2009 ; Thingstad et al., 2005*) ont clairement démontré qu'il existe une grande partie de la DOM dans les eaux de surface méditerranéennes qui est accessible aux bactéries si le déficit en phosphate est atténué.

Les études ci-dessus illustrent que la disponibilité de nutriments inorganiques et organiques peut directement limiter la croissance bactérienne et l'utilisation de la DOM. De plus, les changements dans la limitation des nutriments minéraux et la stœchiométrie peuvent également provoquer des réponses importantes et inattendues de l'écosystème. Thingstad (*2003*) a proposé que l'accumulation de la DOM dégradable dans les eaux de surface est causée par un mauvais fonctionnement de la boucle microbienne. Selon cette hypothèse, la consommation de carbone par les bactéries hétérotrophes serait limitée en raison des mécanismes du réseau trophique contrôlant à la fois la croissance et la biomasse bactérienne. Le taux de croissance serait maintenu faible par la concurrence bactérie-phytoplancton pour les nutriments minéraux, et la biomasse serait maintenue faible par les prédateurs. Ces réponses peuvent avoir des implications majeures sur le transfert de carbone et l'accumulation de DOM dans les systèmes marins (*Thingstad et al., 2005*). Cependant, d'après de nombreuses études, les bactéries ont de nombreux avantages compétitifs face au phytoplancton. Par exemple, dans une expérience en mésocosme, les bactéries ont supplanté le phytoplancton pour l'utilisation des nutriments après quelques jours (*Tanaka et al., 2009*). De même, dans une expérience *in situ* à grande échelle dans le gyre de Chypre, l'ajout de phosphate a augmenté la production bactérienne, tandis que les concentrations de chlorophylle a ont diminué (*Thingstad et al., 2005*). Dans l'Arctique, le

phytoplancton a été supplanté par les bactéries lorsque la DOM labile a été ajoutée dans des conditions riches en nutriments, et malgré cet ajout, moins de carbone organique s'est accumulé dans le système (*Thingstad et al., 2008*). Les petites cellules telles que les procaryotes hétérotrophes ont un rapport surface/volume élevé qui leur confère un avantage compétitif pour l'azote, le phosphate et d'autres composés dissous. Cet avantage compétitif va favoriser l'absorption des nutriments inorganiques par les bactéries hétérotrophes au détriment de la croissance des organismes autotrophes. Cela diminuera la production de composés organiques, ce qui par la suite limitera la croissance des procaryotes hétérotrophes par le carbone organique (*Kirchman, 2012*). Par conséquent, même en dehors des caractéristiques géographiques distinctes de la limitation des éléments nutritifs, l'utilisation bactérienne de la DOM peut être largement contrôlée par les interactions biotiques.

Ainsi, il existe des preuves que la DOM peut s'accumuler dans des conditions limitant les éléments nutritifs. Le régime des nutriments inorganiques peut être un facteur important dans le contrôle de la stœchiométrie de la DOM fraîchement produite et, par conséquent, de sa labilité (*Ogawa et al, 1999 ; Carlson et al, 2000*). Dans les eaux de surface océaniques, la rareté des phosphates peut donc limiter la productivité microbienne (*Krom et al., 1991 ; Cotner et al., 1997 ; Thingstad et al., 2005*). Cependant, ces environnements ont également des formes biodisponibles de phosphore incorporées dans la DOM auxquelles les procaryotes, ayant les voies métaboliques de transport et d'hydrolyse nécessaires peuvent accéder pour compléter leurs besoins en phosphore. Dans les environnements océaniques oligotrophes, l'inventaire des composés de phosphore organique dissous (DOP) dépasse généralement le pool de phosphate disponible (*Björkman et Karl, 2003 ; Lomas et al., 2010*). Les microorganismes ont développé des voies enzymatiques spécialisées conçues pour rompre la liaison C-P afin d'assimiler le phosphore (*White et Metcalf, 2007*). Ces voies sont répandues dans les microorganismes marins, en particulier chez les protéobactéries et leur distribution semble varier d'un écosystème à l'autre (*Villarreal-Chiu et al., 2012*). Cette voie enzymatique devient plus répandue à mesure que les concentrations en phosphate diminuent (*Martinez et al., 2010*). Elle est particulièrement enrichie dans la mer Méditerranée et l'océan Atlantique Nord, deux régions qui présentent des périodes prolongées d'appauvrissement du phosphate. Tout comme le phosphore, l'azote peut également être incorporé dans la DOM et biodisponibles pour les microorganismes capables de l'utiliser. Étant donné que le l'azote organique dissous (DON) est composé de nombreux substrats organiques différents, l'absorption et le métabolisme du DON doivent impliquer de multiples protéines de transport et des enzymes extracellulaires et intracellulaires. Le DON

constitue une source d'azote non négligeable pour les procaryotes hétérotrophes lorsque la concurrence avec le phytoplancton est importante et que l'apport d'azote inorganique est limité.

I.2.3.3. La température

La température, comme les éléments chimiques essentiels et les substrats organiques, est toujours un facteur pouvant stimuler ou limiter la prise en charge de la DOM par les microorganismes. En particulier, la température doit être considérée comme un facteur interactif car elle affecte tous les processus chimiques et biochimiques. De tous les paramètres environnementaux, la température est celui qui a le plus d'impact sur les activités bactériennes parce qu'elle influence directement les réactions enzymatiques générées par tous les microorganismes dont les bactéries et qu'elle impacte les capacités de croissance des communautés (*Kirchman, 2012*). La croissance bactérienne diminue à mesure que les températures s'éloignent des valeurs optimales pour chaque type de bactérie dans les études en laboratoire (*Robertson et al., 1982*). Cependant, une forte relation positive existe entre la croissance bactérienne et la température dans les assemblages naturels de bactérioplancton (*White et al., 1991 ; Reitner et al., 1997*). Si les basses températures inhibent la croissance et la production bactérienne (*Pomeroy et Deibel, 1986 ; Pomeroy et al., 1991 ; Shiah et Ducklow, 1994*), une relation positive entre la température et le temps de prise en charge de la DOM et donc sa labilité serait également attendue. La température pourrait donc influencer indirectement la labilité de la DOM via un contrôle de l'activité microbienne.

I.2.3.4. Les capacités fonctionnelles des communautés

En plus des paramètres abiotiques, la communauté microbienne peut jouer un rôle important dans la régulation de l'accumulation et de la reminéralisation subséquente de la DOM. En effet, il a été démontré que la biodisponibilité de la DOM et son utilisation n'étaient pas seulement liées aux propriétés des substances dissoutes, mais aussi à la capacité d'utilisation des ressources par les communautés microbiennes (*Roller et Schmidt, 2015 ; Song et al., 2017*). Par exemple, dans le nord-ouest de la mer des Sargasses, les stocks de DOC s'accumulent rapidement dans la zone euphotique peu de temps après la stratification de la colonne d'eau et persistent à des concentrations élevées tout au long de l'été jusqu'au début de l'automne (*Carlson et al., 1994 ; Hansell et Carlson, 2001*). Pendant le renversement saisonnier, une partie du DOC accumulé de façon saisonnière peut être exportée à des profondeurs > 200 m. Une fois isolé dans la zone aphotique, le DOC exporté est reminéralisé assez rapidement sur des échelles de

temps allant de quelques semaines à plusieurs mois (*Carlson et al, 1994 ; Hansell et Carlson, 2001*). Pourquoi la DOM produite de manière saisonnière échappe-t-elle à la dégradation microbienne rapide en surface mais devient disponible pour la reminéralisation microbienne en profondeur ? Cette question reste souvent sans réponse mais certains auteurs suggèrent que la diversité microbienne pourrait être cruciale pour le recyclage de la fraction semi-labile, indiquant que la dégradation de la DOM récalcitrante peut augmenter selon la structure de la communauté microbienne et des capacités enzymatiques des espèces qui la composent (*Nelson et Wear 2014 ; Pedler et al. 2014*). Par conséquent, il devient évident que la distribution des traits microbiens au sein des communautés est également déterminante dans la reminéralisation et la transformation microbienne de la DOM.

I.3. Objectifs

Le cycle global du carbone est actuellement dérégulé par les activités humaines qui accentuent l'accumulation de carbone sous forme de CO₂ dans l'atmosphère. Les océans assurent un service écosystémique dit de régulation en piégeant une partie du CO₂ tamponnant ainsi l'impact de l'Homme sur le climat. A travers l'état de l'art qui vient d'être réalisé, il a été montré que les activités microbiennes jouent un rôle clef dans ce service écosystémique. Via la photosynthèse, le phytoplancton transforme le CO₂ en matière organique. Une part importante de cette matière organique est excrétée dans le milieu sous forme de matière organique dissoute (DOM), rejoignant le pool de DOM d'origine terrigène. Cet ensemble de DOM marine représente une quantité de carbone semblable à celle contenue dans l'atmosphère et joue donc un rôle clef dans le cycle global du carbone. Dans l'océan, la DOM est prise en charge par les procaryotes hétérotrophes selon trois voies : la production de biomasse, la transformation en DOM récalcitrante ou la minéralisation en CO₂. Cette minéralisation représente ainsi une source de CO₂ atmosphérique dont l'ampleur dépend de la prise en charge et de l'utilisation de la DOM par les procaryotes hétérotrophes. Ces différentes contributions microbiennes respectent des équilibres naturels influencés par les saisons et la disponibilité en ressources nutritives, et conduisent à la dominance du rôle de puits de CO₂ par les océans. Cependant, les zones côtières, sous influence du lessivage des continents et des activités anthropiques, sont des zones particulières dans lesquelles la biodisponibilité de la DOM pour les procaryotes hétérotrophes pourrait être très hétérogène en raison de perturbations de certains facteurs biotiques ou abiotiques contrôlant la labilité de la DOM. Compte tenu de l'augmentation actuelle des emprises humaines sur le littoral, de telles modifications environnementales nécessitent d'être précisées. Dans ce contexte scientifique, cette thèse a pour objectif *i)* d'étudier les variations à petite échelle spatio-temporelle des propriétés de la DOM dans des zones côtières contrastées, *ii)* de caractériser le lien entre ces propriétés et la labilité de la DOM et *iii)* de déterminer les sources pouvant expliquer les variations observées. Ainsi, la suite de ce manuscrit se décline en 5 chapitres parmi lesquels 3 sont présentées sous forme d'articles scientifiques, 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 permettant leur interprétation.

Le chapitre III s'articule autour de deux études complémentaires. La première (article I) consiste à tester la pertinence d'une approche expérimentale pour évaluer l'hétérogénéité spatio-temporelle des propriétés de la DOM en zone côtière via son potentiel de stimulation de la base hétérotrophes du réseau trophique planctonique. La seconde (article II) est consacrée à l'étude des variations spatio-temporelles des propriétés de la DOM dans un environnement côtier sous influence anthropique contrastée. En parallèle du suivi *in situ*, l'influence des variations temporelles et des perturbations climatiques ponctuelles sur le potentiel de croissance des procaryotes hétérotrophes a également été étudié.

Le chapitre V (article III) présente les résultats d'une expérience d'incubation réalisée en laboratoire afin, dans un premier temps, de caractériser le lien entre les propriétés de la DOM et sa labilité et, dans un second temps, de hiérarchiser les facteurs modifiant la labilité de la DOM pour les procaryotes hétérotrophes. Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques contrôlant la labilité biologique de la DOM sont connus, cependant, ils sont rarement étudiés simultanément et la hiérarchie de leurs influences respectives reste un sujet de débat. De plus, la combinaison de la caractérisation au niveau moléculaire de la DOM et de l'étude de la dynamique de la structure des communautés permet une caractérisation complète et confère à cette étude une certaine originalité.

Le chapitre VI s'articule autour de deux études différentes (article IV et V). L'objectif de ce chapitre est de déterminer les sources potentielles de DOM biodisponible pour les procaryotes hétérotrophes avec une attention particulière sur le rôle de la colonne sédimentaire. La première étude est consacrée au diagnostic de l'influence de la colonne sédimentaire sur la qualité des eaux et le fonctionnement de la base du réseau trophique pélagique via l'utilisation de radioéléments. La seconde étude a permis d'investiguer les changements que pouvaient causer une remise en suspension de sédiment sur les substances dissoutes et sur le fonctionnement de la base hétérotrophe du réseau trophique.

Le chapitre V 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.

CHAPITRE II.

MATERIEL ET METHODES

L'objectif de ce chapitre est de dresser un portrait détaillé de toutes les stratégies d'échantillonnage et méthodes d'analyse qui ont été utilisées dans ce travail de thèse. Les sites d'échantillonnage et les paramètres biogéochimiques et biologiques mesurés lors du suivi *in situ* mais aussi lors des expériences en laboratoire seront présentés ici ainsi que les outils d'analyses statistiques utilisés pour traiter les données.

II.1. Les zones côtières étudiées

Les différents sites échantillonnés durant cette thèse sont tous regroupés en mer Méditerranée. La mer Méditerranée est caractérisée par une insuffisance biologique, elle est donc qualifiée de mer oligotrophe (*Siokou-Frangou et al., 2010*). Elle est quasiment dépourvue de plateaux continentaux essentiels à la prolifération d'espèces marines. Cependant, même si la Méditerranée est pauvre en biomasse, sa biodiversité est finalement très importante. Elle est considérée comme un « hot spot » de biodiversité et abrite 7 à 18% de la faune et la flore mondiales, respectivement (*Myers et al., 2002*). La mer Méditerranée comporte des caractéristiques dynamiques et biologiques très variées que l'on retrouve dans le mécanisme global de l'océan mondial. Son étude permet donc la compréhension de phénomènes qui dépassent ses propres frontières. Les sites étudiés dans ces travaux de thèse sont tous localisés dans des zones côtières. Les milieux côtiers sont définis comme des zones couvrant le plateau continental de 0 à 200m de profondeur. Ce sont des zones de transition et d'échanges entre le continent et l'océan ouvert. Bien qu'ils ne représentent que 7% de la surface totale et seulement 0,5% du volume des océans mondiaux, les milieux côtiers jouent un rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'oxygène et des éléments nutritifs à l'échelle planétaire (*Walsh, 1991 ; Frankignoulle et al., 1998 ; Rabouille et al., 2001 ; Chen et Borges, 2009*). Ils contribuent à hauteur de 25% à la production primaire océanique totale, de 80% à l'enfouissement du carbone organique et de 40% au dépôt du carbonate de calcium dans les océans (*Wollast, 1991 ; Gattuso et al., 1998*). Les milieux côtiers sont également responsables

de 18% de l'absorption nette du dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique (0,3 Gt C.an⁻¹) (*Borges, 2011*). Il est donc clairement reconnu que les milieux côtiers ont un rôle essentiel dans le cycle global du carbone et doivent être inclus dans les bilans régionaux (*Borges et al., 2006*) et globaux (*Thomas et al., 2004*).

Cependant, les milieux côtiers sont généralement difficiles à étudier. En effet, dans cet environnement les processus physiques, chimiques et biologiques sont très complexes et interagissent à des échelles spatiales et temporelles très variables. Les grandes disparités régionales et temporelles, qui sont la caractéristique principale du domaine côtier, sont sans équivoque un frein à la meilleure compréhension de son fonctionnement et des flux qui lui sont associés. La diversité des processus hydrodynamiques, les forts gradients de salinité et de température, les fluctuations dans les apports fluviaux en matière organique terrestre et en éléments nutritifs, et les propriétés de l'océan ouvert adjacent rendent chaque système côtier complexe et souvent unique.

Les milieux côtiers méditerranéens sont soumis à d'importantes activités humaines dues aux forts développements urbains sur les littoraux. La population totale des pays méditerranéens a presque doublé entre 1970 (281 millions d'habitants) et 2010 (472 millions d'habitants). Conjointement avec cet accroissement de population, le développement d'infrastructures (habitations, zones portuaires, zones agricoles, réseaux routiers) et d'activités industrielles (métallurgie, chimie, bois, etc.) a connu un véritable essor, rejetant un nombre important de contaminants et de déchets dans l'écosystème. Les perturbations que subissent les écosystèmes côtiers sont multiples : introduction de contaminants chimiques et microbiologiques, eutrophisation liée à l'apport excessif de sels nutritifs, invasion d'espèces exotiques, aménagement du littoral et des bassins versant, aquaculture, pêches intensives (*Nicholls et al., 2007*). Ces perturbations font des zones côtières méditerranéennes des hot spot de contamination (*Laubier, 2005*).

Ainsi, bien que la communauté scientifique ait pris conscience depuis plusieurs années de la nécessité d'étudier les milieux côtiers, la complexité et la diversité des échelles spatiales et temporelles des processus physiques et biogéochimiques s'y déroulant ont probablement contribué à ralentir l'émergence de recherches intégrées. Il apparaît aujourd'hui essentiel de mieux comprendre le fonctionnement des zones côtières méditerranéennes pour estimer leur contribution réelle dans les flux de carbone et pour évaluer leur comportement et leur évolution face aux pressions anthropiques locales.

Pour des approches d'observation des variations de la biodisponibilité de la DOM, ce travail a été centré sur le site atelier de la rade de Toulon. A titre de comparaison, ces observations ont

également été réalisées sur un site côtier mais dans une zone préservée et ouverte sur le large se trouvant au niveau de la Presqu'île de Giens. Pour une approche expérimentale consistant à caractériser l'influence d'une remise en suspension des sédiments sur la biodisponibilité, le port de Carnon a également servi de site d'étude dans le cadre d'un projet financé par la région Occitanie.

II.1.1. La rade de Toulon

La zone d'étude de ce travail de thèse est principalement concentrée sur la rade de Toulon, zone côtière située dans le bassin Nord-Ouest de la mer Méditerranée. La rade de Toulon est divisée par une digue en deux sous parties : la petite rade (PR) et la grande rade (GR). La PR est semi-fermée, a une superficie de 9,8 km² et une profondeur moyenne de 12m. 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. 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, notamment lorsque le vent change de direction (*Dufresne et al., 2014*). La région de Toulon est soumise à deux régimes de vent principaux : le Mistral (venant du Nord) et le vent d'Est. 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. La circulation des masses d'eau influence le temps de résidence, qui correspond au temps de renouvellement de toute l'eau d'une zone. Dans la PR, le temps de résidence d'une masse d'eau est de 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 (*Dufresne et al., 2014*). Les apports en eau douce de la PR se limitent à un fleuve côtier nommé le Las, de faible débit (10 m³.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 avec un débit généralement faible, similaire à celui du Las (*Nicolau, 2005*).

L'agglomération de Toulon (~ 500 000 habitants) est le siège d'activités industrielles, commerciales, touristiques, militaires et aquacoles. La majeure partie de ces activités se concentrent dans la PR. Toulon est le premier port militaire français, où siège 60% de la flotte de la Marine Nationale (6 sous-marins et 37 bâtiments). Les 5 ports de plaisance localisés dans la PR peuvent accueillir 2480 bateaux. Les activités conchylicoles s'étendent sur 10 hectares et

produisent 200 tonnes de coquillages chaque année. Les activités piscicoles produisent 200 tonnes de poissons chaque année. La GR est essentiellement soumise aux activités touristiques avec de nombreuses plages et bases de loisir. Ainsi la rade de Toulon est le siège d'une intense activité anthropique, qui, en plus de son passif militaire, entraîne une perturbation importante de l'écosystème côtier et une contamination des sédiments et de la colonne d'eau.

La rade de Toulon, a été choisie comme site d'étude en raison des forts gradients environnementaux et biologiques observés dans la colonne d'eau à une échelle géographique restreinte (*Coclet et al., 2018 ; 2019 ; 2020*). Plusieurs études font référence à une contamination multiple de la rade de Toulon par des composés métalliques, organométallique et organiques dans les sédiments et la colonne d'eau. Des mesures de concentrations en Cu, Pb et Zn ont révélé un très forte contamination des sédiments et de la colonne d'eau 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 faible (*Tessier et al., 2011 ; Dang et al., 2015 ; Misson et al., 2016 ; Coclet et al., 2018*). La PR montre également une contamination en composés organométalliques, en particulier en Tributylétain (TBT) et des produits issus de sa dégradation (DBT et MBT), dont l'origine serait principalement due à l'utilisation de peintures antifouling (*Pouget et al., 2014 ; Misson et al., 2016*). Le gradient de contamination en composés organométalliques est le même que celui des éléments traces métalliques (ETM), avec une contamination maximale au niveau des chantiers navals et des concentrations relativement faibles à la sortie de la GR.

II.1.1.1. Le port de Toulon Vieille Darse

De nombreuses études s'intéressent aux réponses des écosystèmes côtiers sous l'influence de contaminations chimiques dues aux activités anthropiques (*e.g. Pringault et al. 2016 ; Coclet et al. 2019*). Cependant, très peu d'études prennent en compte l'impact des pressions anthropiques sur le fonctionnement biogéochimique, en particulier le devenir des composés organiques et des nutriments. Il en résulte une connaissance limitée du cycle de la DOM, une composante mal résolue du cycle du C marin et fortement contrôlée par les communautés microbiennes hétérotrophes. Il est apparu nécessaire d'enrichir les observations biogéochimiques sur le site atelier du port de Toulon Vieille Darse qui représente une des zones les plus impactées par les activités anthropiques de la rade afin de permettre à plus long terme de mieux comprendre les perturbations et les modifications que peuvent entraîner ces activités humaines sur le cycle du carbone.

II.1.1.2. La Baie du Lazaret

La baie du Lazaret située dans la rade de Toulon en mer Méditerranée a été choisie pour tracer les sources potentielles de DOM biodisponible pour les procaryotes hétérotrophes dans une zone géographiquement restreinte et perturbée par les activités anthropiques. C'est un site d'intérêt pour répondre à cet objectif car il rassemble de nombreuses sources potentielles d'apports organiques allochtones. C'est une zone de trafic maritime intense qui accueille également l'activité de ravitaillement des bâtiments militaires. Elle est définie comme l'un des points chauds de la contamination par le plomb et le mercure (*Claisse et al., 1992*). La présence d'aquaculture, d'une zone portuaire ainsi que d'autres activités anthropiques comme les navettes de transport en commun ou la fréquentation touristique peuvent également être une autre source d'apports nutritifs importants pouvant favoriser la base hétérotrophe. Dans la baie du Lazaret, les sédiments ont également été identifiés comme une source de contaminants chimiques et bactériologiques (*Arnal et al., 2001 ; Dang et al., 2015*).

II.1.2. La Baie du Niel (Presqu'île de Giens)

La baie du Niel, située sur la face Sud de la Presqu'île de Giens au pied du pic du Niel a la particularité d'avoir un petit bassin versant et donc une faible influence continentale. C'est une zone ouverte sur le large, régulièrement balayée par les courants. Elle est située à proximité de la rade de Toulon, exposée à des conditions climatiques similaires. Cependant, contrairement à la rade de Toulon, elle est soumise à une faible pression anthropique. Seulement six bateaux de pêche résident dans la baie à l'année (Métropole Toulon Provence Méditerranée). Ainsi dans ces travaux de thèse, la baie du Niel a été choisie comme site de référence permettant une comparaison avec la rade de Toulon.

II.1.3. Le port de Carnon

Dans le cadre du projet ECODREDGE financé par la région Occitanie porté par Christelle Montigny (laboratoire HydroSciences Montpellier), le port de Carnon a été choisi comme site d'étude pour réaliser une expérience en laboratoire simulant une remise en suspension de sédiment et investiguer les réponses fonctionnelles trophiques et biogéochimiques. Le port de Carnon est situé sur le littoral méditerranéen dans le département de l'Hérault dont l'activité économique principale est le tourisme (*Tailhades, 2012*). Carnon est une station balnéaire et portuaire, développée dans les années 1970, sur le cordon littoral isolant l'étang de l'Or de la mer Méditerranée. Le port de plaisance de Carnon a une capacité de 800 places à flot et présente

deux aires de carénage ainsi qu'une pompe de ravitaillement en carburant. Il a la particularité d'être entrecoupé par le grau d'une lagune reliant l'étang de l'Or, l'étang de Pérols, le canal du Rhône à Sète et la mer Méditerranée, induisant un contexte hydrologique particulier. Le port est sous influence des apports en eau saumâtre des étangs voisins et des apports d'eaux côtières. Ce site est donc soumis à de nombreuses sources de variabilité couramment rencontrées dans les zones côtières.

II.2. Prélèvements et analyses chimiques

Les méthodes de prélèvements, traitement et conservation des échantillons ont été optimisées afin de ne pas dégrader la nature des échantillons tout en répondant aux contraintes analytiques.

II.2.1. Prélèvement d'eau de mer

De manière générale, l'ensemble du flaconnage (bouteilles en téflon (FEP : Fluorinated Ethylene Propylene, NALGENE), bidons en polyéthylène basse densité (LDPE)), du matériel utilisé lors des différentes campagnes de prélèvements et lors des manipulations et analyses effectuées en laboratoire (tubes, matériel de filtration, etc...) a subi un protocole de nettoyage suivant des conditions appropriées aux substances étudiées et aux techniques analytiques utilisées afin de limiter les risques de contamination.

Pour l'ensemble des suivis de terrain et des expériences de laboratoire réalisés au cours de cette thèse, les échantillons d'eau ont été prélevés avec un échantillonneur d'eau horizontal de type van Dorn (Wilco, modèle Beta) préalablement nettoyé avec de l'acide (10% v/v HCl, qualité analytique, Fisher Scientific) et soigneusement rincé avec de l'eau Milli-Q (18,2 M Ω , Millipore) au laboratoire. Sur le terrain, pour conditionner l'échantillonneur et éliminer les traces du protocole de nettoyage, la bouteille van Dorn a été rincée avec de l'eau de mer du site à échantillonner avant le prélèvement. L'eau de mer prélevée a été stockée dans une bouteille FEP pour les volumes inférieurs à 2L ou dans un bidon en LDPE pour les volumes supérieurs à 2L. Ces contenants ont systématiquement été préalablement rincés trois fois à l'eau Milli-Q (18,2 M Ω , Millipore), lavés à l'acide (10% v/v HCl, qualité analytique, Fisher Scientific) pendant 24 heures sous agitation, rincés à nouveau trois fois avec de l'eau Milli-Q (18,2 M Ω , Millipore) puis remplis d'eau Milli-Q acidifiée (0,1 % v/v HCl, Trace Metal Grade, Fluka). Sur le terrain, le bidon ou la bouteille en FEP a été également rincé trois fois avec de l'eau de mer du site à prélever. Toutes les bouteilles FEP ou les bidons utilisés au cours de cette thèse ont subi le même protocole de conditionnement décrit ci-dessus.

Afin de conserver autant que possible les caractéristiques du milieu, le traitement des échantillons pour conservation avant analyse ou pour la partie expérimentale a été effectué dès l'arrivée au laboratoire, et au maximum dans les 2h qui suivent le premier prélèvement.

II.2.2. Mesures in situ des paramètres physico-chimiques de l'eau

Les caractéristiques physico-chimiques incluant la température (°C), la salinité et la concentration en chlorophylle a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans la colonne d'eau sur les différents sites échantillonnés ont été mesurées à l'aide d'une sonde multi-paramètres calibrée en laboratoire avant chaque prélèvement (Hydrolab DS5, OTT).

II.2.3. Mesure des concentrations en nutriments

L'eau de mer est principalement constituée de sels dissous ou d'ions, provenant en grande partie de la décomposition des roches de la croûte terrestre. La majorité de ces éléments sont conservatifs, c'est à dire peu affectés par les processus chimiques et biologiques (*Castro et Huber, 1997*). Les autres ions présents montrent des concentrations très faibles (≤ 1 partie par million), et ont pour la plupart un comportement non conservatif. Parmi eux, on retrouve les nutriments, qui sont des composés chimiques essentiels au maintien et la croissance des organismes vivants en particulier du phytoplancton et des bactéries hétérotrophes. Les nutriments peuvent se retrouver sous deux formes : organique ou inorganique (*i.e.* minérale). Les formes organiques s'organisent autour de matière carbonée alors que les formes inorganiques sont dépourvues de substituant carbonés. Parmi les nutriments, on distingue les macro-nutriments (carbone (C), phosphore (P), azote (N) et silicium (Si)) qui fournissent la matière et l'énergie nécessaires pour le développement et les fonctions métaboliques des organismes vivants (*Hecky et Kilham, 1988*). Le silicium est utilisé principalement par les organismes à squelette siliceux tandis que le carbone, l'azote et le phosphore sont des éléments essentiels pour tous les organismes vivants. Pour cette raison, les travaux présentés dans cette thèse se concentreront sur l'étude du carbone, de l'azote et du phosphore qui se trouvent être les macronutriments les plus utilisés par les microorganismes hétérotrophes.

L'étude des nutriments dans le milieu marin est essentielle pour comprendre le fonctionnement d'un écosystème. En effet, les nutriments sont au cœur de nombreux cycles biogéochimiques et leur assimilation est le préambule de tout réseau trophique. Dans le milieu marin, leur distribution dans la colonne d'eau est évidemment tributaire de l'activité biologique mais aussi de différents processus physiques. En Méditerranée, la distribution spatiale des concentrations

en nutriments est relativement bien connue à l'échelle du bassin. En revanche, très peu d'études ont porté sur la variabilité temporelle des nutriments en zone côtière (*Souvermezoglou et al., 1992 ; Psarra et al., 2000 ; Kress et Herut, 2001 ; Marty et Chiavérini, 2002*).

II.2.3.1. Dosage du carbone organique dissous

Déterminer la concentration en carbone organique dissous (DOC) dans le milieu marin est important pour trois raisons principales :

- Le DOC participe au cycle du carbone, cycle dont on connaît le rôle sur la régulation du climat de la Terre (*Sarmiento et Gruber, 2002*). Il s'agit là, entre autres, de quantifier la capacité des eaux à constituer un puits de carbone ou au contraire à jouer un rôle de source de CO₂. Dans le cas des océans, au vu de l'énorme réservoir de carbone qu'ils constituent, l'étude du DOC est d'autant plus importante.
- Le DOC contrôle pour une grande part la productivité des écosystèmes aquatiques, en fournissant le substrat organique et donc l'énergie dont les organismes hétérotrophes ont besoin. Doser le DOC participe ici à l'étude de la dynamique de la ressource trophique des écosystèmes aquatiques (*e.g. Janson, 1998 ; Jones, 1998*).
- Certaines molécules organiques dissoutes dans les eaux peuvent jouer le rôle de ligands pour des éléments inorganiques comme par exemple certains éléments traces métalliques (*e.g. Murphy et Zachara, 1995*). Certaines molécules organiques ont des caractéristiques leur conférant des propriétés complexantes. Doser le DOC est dans ce cas un moyen d'accéder à la spéciation des métaux en solution (contrôle de la mobilité et de la biodisponibilité des métaux).

Le dosage du DOC est indirect. Les méthodes sont basées sur l'oxydation des matières organiques, la concentration en DOC étant déterminée soit en mesurant la quantité de CO₂ produite, soit en déterminant la quantité d'oxygène consommée par la réaction d'oxydation. Trois méthodes d'oxydation sont pratiquées, celles-ci étant parfois combinées pour optimiser les rendements :

- Photo-oxydation : dans cette méthode, la matière organique est oxydée par un rayonnement UV (*Collins et Williams, 1977*) couplé à une oxydation chimique.
- Oxydation chimique : plusieurs oxydants peuvent être utilisés, comme le persulfate de sodium ou le permanganate de potassium. L'efficacité d'oxydation est généralement accélérée par une augmentation de la température (oxydation chimique à chaud).

- Oxydation thermique : l'oxydation thermique consiste à oxyder le carbone organique dans un four à haute température en présence ou non d'un catalyseur.

Dans ce travail, les analyses de DOC ont été effectuées par oxydation thermique à l'aide d'un TOC-VCSH (Shimadzu) équipé d'un passeur d'échantillons ASI-5000A avec une précision de $0,1 \text{ mgC.L}^{-1}$ ($1,2 \text{ }\mu\text{M}$) et une limite de quantification de $0,5 \text{ mgC.L}^{-1}$ ($6 \text{ }\mu\text{M}$). La concentration en DOC est déterminée en transformant le carbone organique en dioxyde de carbone. Tout d'abord, le carbone inorganique dissous est éliminé par acidification et dégazage par O_2 . Ensuite, le carbone présent dans l'échantillon est oxydé à 680°C sous flux d' O_2 en présence d'un catalyseur (billes d'alumines enrobées de platine). Cette étape permet de volatiliser en CO_2 la totalité des formes carbonées contenues dans l'échantillon. Le flux continu en O_2 va entraîner le CO_2 formé vers un déshumidificateur et un piège halogène avant de parvenir à la cellule de détection infra rouge. La réponse du détecteur est visualisée sous la forme d'un pic dont la surface est proportionnelle à la concentration en DOC. Pour chaque échantillon, la mesure est réalisée à partir de $100 \text{ }\mu\text{L}$ et répétée au moins trois fois. Si le coefficient de variation relative (CVR) est supérieur à 2%, l'appareil effectue une mesure supplémentaire jusqu'à l'obtention d'une déviation correcte. L'appareil donne la moyenne des 3 mesures conduisant à la déviation standard la plus faible. 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.

II.2.3.2. Dosage de l'azote et du phosphore

Il existe cinq états d'oxydo-réduction relativement stables d'azote inorganique dissous (DIN) dans l'environnement marin : nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), oxyde nitreux (N_2O), ammonium (NH_4^+) et la forme de loin la plus abondante (plus de 95% de l'azote dissous) étant le diazote atmosphérique (N_2) dissous, inaccessible pour la plupart des espèces (*Karl et al., 2002*). Les formes d'azote normalement utilisables par le phytoplancton sont les ions NO_3^- , qui représentent 88% de l'azote fixé (Gruber, 2008), mais aussi NO_2^- et NH_4^+ . À ces formes minérales s'ajoutent les composés organiques (DON), qui ne sont a priori pas assimilés par les organismes phytoplanctoniques, mais que certaines bactéries hétérotrophes peuvent utiliser par voie enzymatique (*Kirchman, 2000 ; Bonk, 2002*).

Le phosphore dans l'eau de mer se présente essentiellement sous forme minérale dissoute (*Moutin, 2000*). La forme préférentiellement utilisée par les organismes phytoplanctoniques est l'ion orthophosphate PO_4^{3-} (*Baturin, 2003*). Par la suite, on utilisera le terme de « phosphate »

pour désigner les ions orthophosphates et plus généralement le phosphore inorganique dissous (DIP). Certaines formes organiques (DOP) peuvent aussi être assimilées par les bactéries hétérotrophes en conditions de forte oligotrophie, mais ces processus restent encore mal connus (*Dyhrman et al., 2009*).

Au cours de cette thèse, les concentrations en nitrate, nitrite, phosphate ont été mesurées par des méthodes colorimétriques à l'aide d'un Technicon Autoanalyser III automatisé (*Treguer et Le Corre, 1975*). Les concentrations totales en éléments (azote total TN et phosphore total TP) ont été déterminées à l'aide la technique d'oxydation par voie humide (*Raimbault et al., 1999*). Les concentrations de DON et de DOP ont été déduites en soustrayant respectivement les concentrations de nitrate et de nitrite de la concentration d'azote total et la concentration de phosphate de la concentration de phosphore total.

II.3. L'étude de la DOM

II.3.1. Les techniques de spectroscopie de fluorescence pour l'étude de la DOM

En raison des multiples sources et des nombreux processus de transformation qu'elle subit, la DOM océanique est un pool de matière complexe, hétérogène, constituée d'une myriade de composés organiques de structure et de poids moléculaire différents, et qui restent pour la plupart (75 %) non identifiés au niveau moléculaire (*Mopper et al., 2007*). Jusqu'à présent, la caractérisation de la DOM dans le milieu marin s'est effectuée via des méthodes globales permettant la quantification du carbone, de l'azote et du phosphore organiques dissous (DOC, DON et DOP). Il existe aussi des méthodes très fines, comme la chromatographie pour l'analyse de composés individuels, ou l'isotopie pour l'analyse des processus de transformation de la DOM (*Mopper et al., 2007*). Les analyses quantitatives globales, relativement simples à mettre en œuvre, peuvent être réalisées sur un nombre important d'échantillons. Même si elles permettent de caractériser le pool global de DOM, elles sont très limitées pour apprécier sa qualité et sa composition. Au contraire, les analyses fines fournissent des informations très pertinentes sur la composition moléculaire de la DOM. Elles permettent par exemple d'estimer les teneurs en acides aminés, en sucres, en lipides ou en acides carboxyliques (chromatographie), et de caractériser les sources et les processus de transformation (isotopie) de la DOM. Cependant, ces analyses ne peuvent pas être appliquées à un nombre élevé d'échantillons. Elles nécessitent généralement de gros volume d'eau (parfois plusieurs litres pour une seule analyse), un traitement et une préparation complexe de l'échantillon, avec des étapes d'extraction, de purification ou de pré-concentration. Ces analyses fines sont donc

longues, délicates, et coûteuses. Les techniques d'analyse faisant intervenir les propriétés optiques de la DOM représentent des solutions intermédiaires intéressantes car elles permettent d'avoir une vision de la composition et de la réactivité de la DOM à faible résolution et à une relativement haute fréquence d'analyse. De plus, elles sont simples à mettre en place car elles ne nécessitent aucun pré-traitement si ce n'est une filtration. Ces caractéristiques ont fortement stimulé l'intérêt de la communauté scientifique et ont permis le développement de différentes analyses.

II.3.2. La matière organique dissoute chromophorique

Une fraction du pool de DOM, appelée la matière organique dissoute chromophorique (CDOM), possède des propriétés optiques permettant son analyse (*Figure II.1*). La CDOM a la capacité d'absorber la lumière dans les longueurs d'onde du visible et de l'UV. Elle contribue fortement à l'absorption de la lumière dans la zone euphotique (*Nelson et Siegel 2013*), expliquant plus de 70% de son absorption dans les 200 premiers mètres (*Siegel et al., 2005 ; Nelson et Siegel 2013*). Ses capacités d'absorption font de la CDOM un facteur clé pour l'écosystème marin car elle représente le principal atténuateur du rayonnement ultraviolet, protégeant ainsi les organismes vivants de leurs effets délétères (*Tedetti et Sempéré, 2006*). Les spectres d'absorbance de la CDOM ont été utilisés comme approximation de la quantité de DOM (*Lønborg et Álvarez-Salgado 2014*). Cependant, ils ne sont pas assez discriminants pour donner des renseignements précis sur sa composition. Parmi les molécules composant le pool de CDOM, une fraction est capable de réémettre une partie de la lumière absorbée, cette fraction est appelée matière organique dissoute fluorescente (FDOM) (*Figure II.1*). Une molécule qui a des propriétés de fluorescence est appelée fluorophore. La spectrométrie de fluorescence permet de caractériser la DOM et d'émettre des hypothèses quant à l'origine des fluorophores (*Hudson et Reynolds., 2007 ; Henderson et al., 2009 ; Ishii et Boyer, 2012*), leurs réactivités chimiques (*Saar et Weber, 1980*) et biologiques (*Rinnan et Rinnan, 2007 ; Zhang et al., 2008*). Depuis une vingtaine d'années, la FDOM a été largement étudiée grâce aux avancées dans le domaine de la spectroscopie de fluorescence, en particulier grâce à la création d'instruments permettant le tracé de spectres en 3D d'excitation et d'émission appelés matrices d'excitation-émission de fluorescence (FEEM) (*Coble, 1996 ; Mounier et al., 1999 ; Parlanti et al., 2000*). Contrairement aux spectres d'absorption, les spectres de fluorescence sont plus discriminants. En effet, ces derniers présentent un ou plusieurs pics sur la gamme de longueurs d'onde d'excitation-émission qui correspondent à un ou plusieurs types de fluorophores (*Hudson et*

Reynolds, 2007 ; Henderson et al., 2009 ; Fellman et al., 2010). Le couple excitation/émission d'un composé fluorescent dépend de sa structure moléculaire, tandis que son intensité de fluorescence est fonction de sa probabilité de présence.

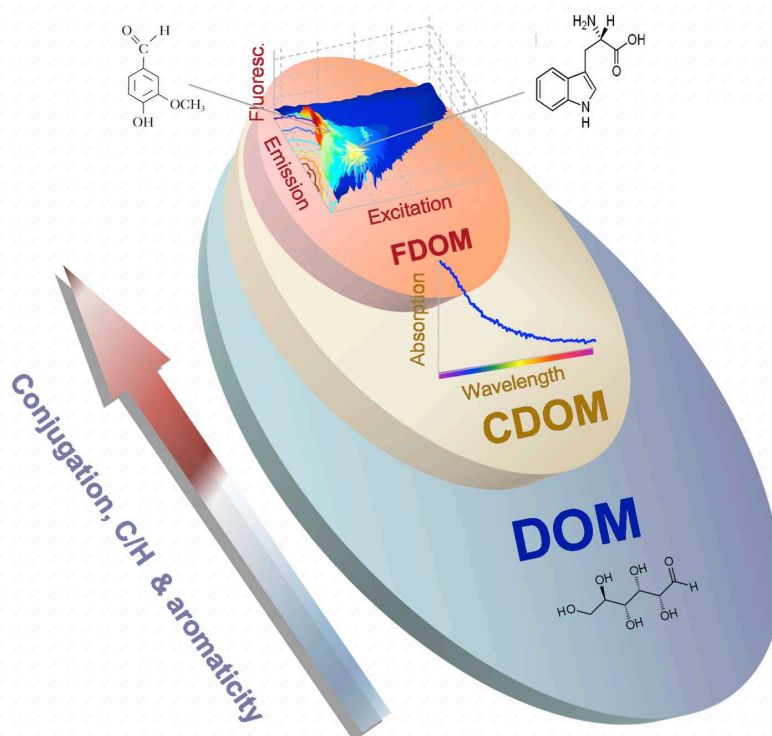


Figure II.1 : Représentation schématique de la DOM chromophorique et fluorescente (CDOM et FDOM, respectivement). (Stedmon et Alvarez-Salgado, 2011)

La fluorescence est généralement mesurée en utilisant des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 240 et 500 nm et des longueurs d'onde d'émission comprises entre 300 et 600 nm et permet de constituer une FEEM sur laquelle apparaissent les pics de fluorescence correspondants à des fluorophores. Les principaux fluorophores observés dans le pool de FDOM se divisent en deux groupes : les substances de type protéique et les substances de type humique (Coble, 1996). Au sein de ces deux groupes, cinq pics de fluorescence ont été identifiés, à des longueurs d'onde d'excitation/émission spécifiques (Nelson et Siegel 2013 ; Aiken, 2014 ; Stedmon et Nelson 2015) (Tableau II.1). Les substances ressemblant à des protéines présentent une fluorescence à des longueurs d'onde caractéristiques du tryptophane ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 275/340 nm, pic T de Coble) et de la tyrosine ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 275/305 nm, pic B de Coble). Le tryptophane domine l'émission et peut masquer l'émission de tyrosine car l'énergie de la tyrosine est utilisée comme énergie d'excitation pour le tryptophane (Yamashita et

Tanoue, 2003). Les substances de type humique présentent un large spectre d'émission à des longueurs d'onde supérieures à celles des substances ressemblant à des protéines. En règle générale, les substances de type humique sont divisées en substances considérées comme ayant une origine terrigène ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 230-260/380-460, pic A de Coble et $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 320-360/420-460, pic C de Coble) ou marine ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ 290-310/370-410, pic M de Coble). Dans les hautes mers, la production de FDOM est généralement associée à la dégradation microbienne de la DOM non fluorescente fraîchement produite (*Nelson et Siegel 2013*). Récemment, des expériences d'incubation ont démontré que le phytoplancton peut être une source importante de FDOM (*Romera-Castillo et al. 2010 ; Bachi et al., 2023*).

Tableau II.1 : Emplacements des pics et des régions couramment référencés pour les composants des matrices d'excitation-émission (EEM) obtenus pour la matière organique dissoute marine (Coble, 2007 ; Stedmon et al., 2003).

Peak label	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	Description of fluorophores
B	275	305	Tyrosine-like, protein-like
T	275	340	Tryptophan-like, protein-like
A	230-260	380-460	Terrestrial humic-like
M	290-310	370-410	Marine humic-like
C	320-360	420-460	Terrestrial humic-like

La spectroscopie de fluorescence fournit donc des informations qualitatives importantes sur un échantillon. Cependant, il convient de garder à l'esprit que l'analyse par spectrométrie de fluorescence ne permet d'étudier qu'une fraction du pool de DOM. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour prendre en compte de façon plus exhaustive la composition moléculaire de la DOM pour la relier à sa labilité biologique.

II.3.3. Diversité moléculaire à haute résolution de la DOM

La DOM marine est le mélange de molécules organiques le plus complexe sur Terre, une caractérisation chimique complète de sa composition est loin d'être atteinte (*Zark et Dittmar, 2018*). Les progrès récents des techniques analytiques ont amélioré notre compréhension de la complexité moléculaire de la DOM. L'étendue des informations moléculaires sur la DOM est largement limitée en raison de sa complexité qui empêche la résolution moléculaire à grande échelle. La proportion de DOM qui peut être caractérisée au niveau moléculaire est donc faible,

par exemple, moins de 10% du carbone organique des eaux profondes peut être affecté à des structures moléculaires (Benner, 2002). Cependant, la détermination des composés chimiques composant la DOM au niveau moléculaire reste la mesure ultime pour sonder le matériau source, l'évolution et le transport de la DOM. Elle est utilisée pour évaluer la distribution des composés en grandes familles de molécules (lipides, protéines, sucres aminés, dérivés de cellulose et lignine, hydrocarbures) ainsi que des informations structurales telles que les fractions aliphatiques et phénoliques (Koch et Dittmar, 2006 ; Šantl-Temkiv et al., 2013 ; Kellerman et al., 2014), voire pour prédire sa labilité (D'Andrilli et al., 2015).

La spectrométrie de masse à ultra haute résolution a ouvert une nouvelle fenêtre analytique pour l'analyse de la DOM (Stenson et al., 2002 ; Kujawinski et al., 2002 ; Stenson et al., 2003). Plus de 20 000 formules moléculaires ont été identifiées dans le pool de DOM naturel par spectrométrie de masse à ultra haute résolution, avec plus de 30 isomères par formule, ce qui signifie plus de 600 000 composés différents (Zark et al. 2017). C'est la seule technique actuellement capable d'atteindre la résolution ($> 200\ 000$ composés) et la précision de masse (souvent $< 0,5$ ppm) requises pour déterminer directement les formules moléculaires des constituants de la DOM. L'attribution de la formule est possible car la DOM se compose de peu d'éléments abondants, principalement de carbone (C), d'hydrogène (H) et d'oxygène (O) et à un degré inférieur d'azote (N), de phosphore (P) et de soufre (S). D'autres éléments sont rares et peuvent être ignorés pour un examen général des structures moléculaires de la DOM. Étant donné que ses constituants représentent diverses classes chimiques, il est efficace de visualiser et d'interpréter les données moléculaires avec des diagrammes de van Krevelen, à savoir des graphiques des rapports atomiques H/C et O/C (Kim et al., 2003) (Figure II.2). La DOM présente généralement une saturation et une oxygénation en hydrogène de $0 < \text{H/C} < 2,5$ et $0 < \text{O/C} < 1,2$. Sur le diagramme de van Krevelen, les molécules se regroupent généralement en régions correspondant aux classes de composés et à leur nature aromatique (Kim et al., 2003 ; Koch et Dittmar, 2006 ; Mopper et al., 2007 ; Podgorski et al., 2012 ; D'Andrilli et al., 2013 ; Minor et al., 2014). Pour étendre ces observations, Kim et al. (2003) ont également proposé l'identification des voies de réaction chimique possibles visualisées à partir d'un diagramme de van Krevelen, pour des plages particulières de rapports H/C et O/C. Ces informations peuvent ensuite être utilisées pour déterminer les sources de DOM, l'évolution, l'influence microbienne, le degré de saturation en hydrogène, en carbone et en oxygène, et les familles structurales potentielles pour évaluer la réactivité et la labilité de la DOM dans un environnement.

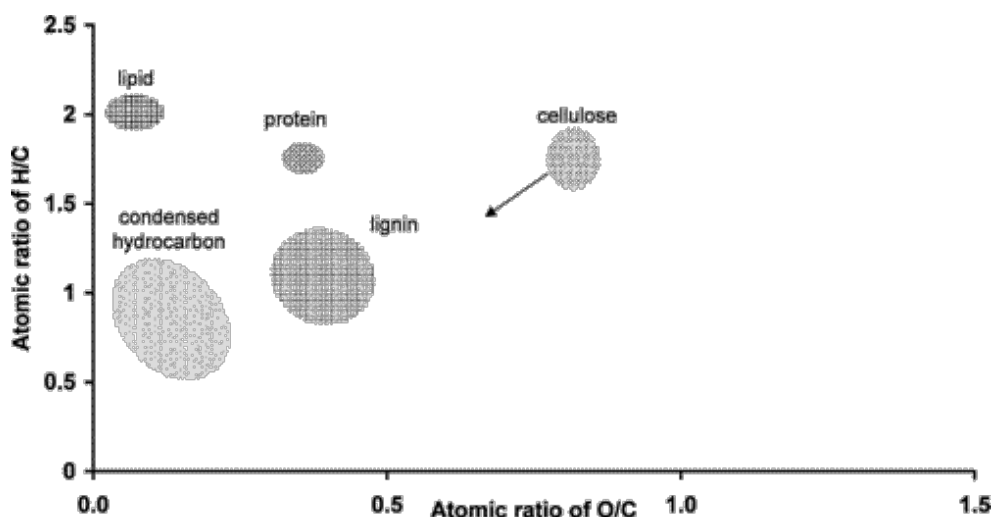


Figure II.2 : Diagramme de van Krevelen représentant les régions associées à certains composants biomoléculaires majeurs déterminées selon leurs compositions élémentaires (Kim *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces techniques d'analyse a permis de mettre en évidence la complexité de la DOM et la variabilité de sa composition dans l'espace et le temps. Cette variabilité peut exercer une influence sur sa biodisponibilité pour les communautés microbiennes et indirectement sur le rôle de puits de carbone des océans.

II.4. Techniques analytiques pour caractériser la DOM

Le dosage des nutriments est uniquement une mesure de la quantité d'atomes de carbone, d'azote ou de phosphore contenus dans un échantillon, sans précision quant à la nature et aux propriétés des molécules dont ces atomes constituent l'architecture. D'autres méthodes, plus spécifiques, doivent être mises en œuvre pour atteindre cette information compositionnelle. Pour caractériser la matière organique, les scientifiques utilisent des méthodologies avancées pour fournir des informations utiles sur la source, la composition et la fonction de la MO dans les compartiments naturels (Louis *et al.*, 2015 ; Sanyal *et al.*, 2020). À l'heure actuelle, de nombreuses méthodes de caractérisation de la matière organique sont disponibles, allant de l'absorption ultraviolet-visible à des techniques plus récentes telles que la spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR-MS) (Leenheer *et Croué*, 2003 ; Nebbioso *et Piccolo*, 2013). Dans ce travail de thèse, l'étude de la composition de la DOM a été réalisée par des techniques de spectrométrie de fluorescence et de spectrométrie de masse dont les principes, les avantages et les inconvénients sont présentés dans les paragraphes suivants.

II.4.1. Analyse de la FDOM par fluorescence

L'étude de la composition de la DOM via l'étude de ses propriétés optiques telles que la fluorescence se révèle être une méthode non destructrice et facile à mettre en œuvre, de plus en plus utilisée dans les milieux aquatiques naturels (*Coble, 2007 ; Fellman et al., 2010 ; Baghoth et al., 2011 ; Gabor et al., 2014*).

II.4.1.1. Le phénomène de fluorescence

La fluorescence est l'un des nombreux phénomènes qui donnent naissance au terme collectif de luminescence. D'une manière générale, la luminescence est définie comme l'émission de lumière par une substance, la lumière émise ne pouvant être attribuée à l'incandescence, c'est-à-dire au rayonnement thermique. Dans le cas de la fluorescence, c'est un phénomène qui survient lorsqu'un composé ayant auparavant été excité par absorption d'énergie issue d'une source lumineuse (type ultraviolet ou visible), présente la faculté plus ou moins prononcée de réémettre cette énergie sous forme de rayonnement. Celui-ci est émis de façon quasi-instantanée, à une longueur d'onde plus grande que celle de la lumière d'origine. Les différents phénomènes énergétiques auxquels une molécule peut être sujette sont illustrés dans la Figure II.3 qui présente le diagramme de Jablonski-Perrin. Il existe trois processus fondamentaux qui sont implicites dans l'émission de lumière par une molécule (*Lakowicz, 2006*) : l'excitation de la molécule (c'est-à-dire l'absorption d'un photon), la relaxation vibrationnelle (décroissance non-radiative) et enfin l'émission de lumière (décroissance radiative). Au cours de l'excitation, l'énergie d'un photon fait passer un électron de la molécule de son état fondamental à un état excité. Le photon perd un peu d'énergie sous différentes formes (radiation, conversion interne, etc.) avant de retrouver son état de repos en libérant l'énergie restante sous la forme d'un photon. D'après la loi de Planck, la longueur d'onde est inversement proportionnelle à l'énergie. Le photon émis a ainsi une plus grande longueur d'onde que le photon incident. Les électrons ne sont pas toujours issus des mêmes sous-couches électroniques et ne seront pas non plus toujours sur la même couche ou sous-couche électronique une fois excités ou après leur relaxation. Il n'existe non pas une valeur mais une gamme de valeurs de longueurs d'onde qui sera absorbée ou émise par un fluorochrome. Pour chaque fluorochrome, un spectre de longueurs d'onde d'excitation et d'émission peut donc être établi.

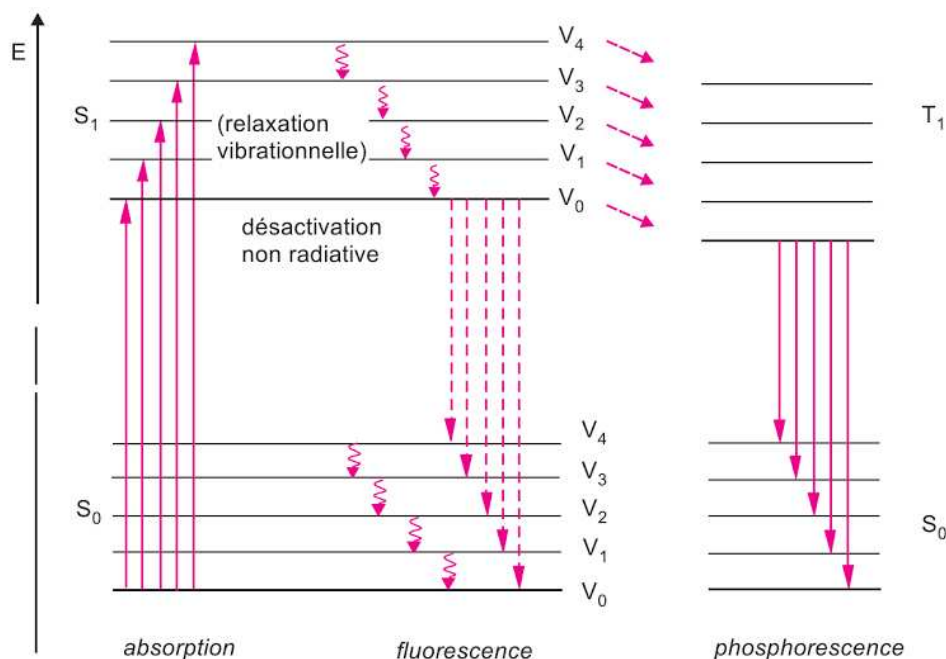


Figure II.3 : Diagramme de Jablonski-Perrin (d'après Rouessac et al., 2004)

Les phénomènes de fluorescence se produisent typiquement dans les molécules de nature aromatiques ou poly-aromatiques présentes dans la MO, qui absorbent (chromophores) et réémettent (fluorophores) de la lumière (Fellman et al., 2010 ; Spender et al., 2010). On nommera ainsi fluorophore, toute molécule susceptible d'absorber l'énergie sous forme de photon à une longueur d'onde spécifique et de la relaxer sous forme d'émission lumineuse spontanée à une longueur d'onde plus importante dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet (Carstea et al., 2012).

II.4.1.2. L'intensité de fluorescence

Pour une longueur d'onde définie, l'intensité de fluorescence (I_f) est dépendante de nombreux facteurs : absorbance, concentration de fluorophores, rendement quantique de la molécule cible ou encore propriétés de la cellule de mesure (Persson et Webborg, 2001). L'intensité de fluorescence peut être définie selon la formule suivante :

$$I_f = 2,3 \times \Phi_f \times I_0 \times \varepsilon \times l \times c$$

I_f : Intensité de fluorescence

I_0 : Intensité radiation excitatrice

ε : coefficient d'absorption molaire

c : concentration molaire

l : épaisseur de la cuve

Φ_f : Rendement quantique de fluorescence

II.4.1.3. Diffusion de Raman et Rayleigh

La diffusion de Raman est issue de la diffusion inélastique de la lumière, signifiant qu'il y a eu perte d'énergie entre le rayonnement diffusé et le rayonnement incident. Il s'agit d'une manifestation optique des propriétés de l'eau (en solution aqueuse) issue de la rétrodiffusion du signal provenant de la vibration moléculaire de la liaison covalente O-H (*Hudson et al., 2007*). Celle-ci est propre au solvant utilisé tout en présentant une sensibilité réduite à la composition de l'échantillon (*Spaak, 2014*). De plus, la quantité d'énergie libérée lors du processus de désexcitation des molécules du solvant est répétable. Cela signifie que les décalages de longueurs d'onde d'intensités de fluorescences émises sont constants pour le solvant. Ainsi, la normalisation des intensités de fluorescence mesurées dans l'échantillon par l'intensité de fluorescence Raman (en une zone de longueur d'onde donnée) mesurée dans le solvant de l'échantillon nous permettra de comparer des mesures réalisées sur différents appareils de spectrométrie de fluorescence.

La diffusion de Rayleigh est une diffusion élastique de la lumière causée par la réémission d'un photon à la même énergie que la lumière résultant de l'excitation (*Andrade et al., 2013*). La diffusion de Rayleigh sera alors observée aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les électrons des molécules vont vibrer à la même fréquence que la lumière incidente induisant l'absorption et l'émission de la lumière à la même énergie.

Il existe deux ordres de diffusion. Le premier ordre est observé à la longueur d'onde pour laquelle l'échantillon est excité et le second au double de la longueur d'onde d'excitation.

II.4.1.4. Propriétés de la matière organique fluorescente

La matière organique dissoute chromophorique (CDOM) est capable d'absorber la lumière dans le spectre du visible (400-700 nm) et de l'ultra-violet (200-400 nm) (*Blough et al., 1993 ; Korshin et al., 1997 ; Coble, 2007*). Un sous-ensemble de la CDOM est défini comme la matière organique dissoute fluorescente (FDOM), par sa capacité à émettre de la fluorescence (*Stedmon et Cory, 2014*).

La spectrométrie de fluorescence permet de différencier les fractions de la DOM via la présence de fluorophores qui dépendent en grande partie des propriétés physico-chimiques intrinsèques de la DOM et de son environnement chimique (*Hudson et al., 2008*). En effet, pour une longueur d'onde d'excitation choisie, les spectres d'émission de fluorescence présentent des variations associées aux paramètres biologiques et physico-chimiques du milieu. Cela permet l'apport d'informations sur la composition de la DOM ou sur les transformations qu'elle subit.

La spectrométrie de fluorescence présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques :

- *Haute sensibilité* : elle est capable de détecter de très faibles concentrations de molécules avec une sensibilité élevée.
- *Spécificité* : elle peut être utilisée pour détecter sélectivement des molécules ou des groupes de molécules spécifiques en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission appropriées.
- *Faible bruit de fond* : elle a généralement un faible niveau de bruit de fond ce qui facilite la détection de signaux de fluorescence faibles.
- *Multiplexage* : elle peut être utilisée pour détecter plusieurs molécules simultanément.
- *Coût et complexité* : elle est relativement peu coûteuse et facile à utiliser, ce qui en fait un instrument accessible à de nombreux scientifiques.

Bien que la spectrométrie de fluorescence présente de nombreux avantages, elle présente également des limites et des inconvénients à prendre en considération :

- *Photoblanchiment* : elle peut entraîner une diminution du signal de fluorescence au fil du temps en raison du photoblanchiment, qui se produit lorsque les molécules fluorescentes sont exposées à la lumière et perdent leur fluorescence.
- *Limitée à certaines espèces moléculaires* : elle ne peut être utilisée que pour détecter des molécules pouvant fluorescer, ce qui signifie qu'elle n'est pas adaptée à la détection de tous les types de molécules.

Il existe trois techniques de mesure de fluorescence différentes :

- *La fluorescence d'émission simple* : l'intensité de fluorescence est acquise pour un couple de longueurs d'onde d'excitation-émission. Cette méthode peut aussi être appliquée pour obtenir un spectre de l'intensité de fluorescence mesurée sur une plage de longueurs d'onde d'émission pour une longueur d'onde d'excitation fixée et inversement.
- *La fluorescence synchrone* : l'intensité de fluorescence est obtenue pour un écart fixe entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation.
- *La fluorescence en trois dimensions* : le scan des longueurs d'ondes d'excitation et d'émissions est réalisé en simultané, il en résulte une matrice d'excitation-émission de fluorescence (FEEM) (Coble, 1996). Cette dernière permet des tracés de FEEM dans une "carte" 3D de l'espace optique permettant la visualisation d'un mélange de fluorophores dans un échantillon donné (Hudson et al., 2007 ; Baker et al., 2007). Dans ce travail de thèse, cette technique a été utilisée afin d'étudier la composition de la DOM dans sa globalité.

Les variations de composition chimique de la DOM peuvent être visualisées via la mesure de paramètres tels que l'intensité maximale de fluorescence (Coble, 1996) ou la localisation des bandes d'excitation et d'émission permettant ainsi d'obtenir des informations sur la quantité, les sources et le caractère humique ou fulvique de la DOM (Stedmon et Bro, 2008 ; Goldman et al., 2012).

II.4.1.5. Les fluorophores d'intérêts de la DOM

Les spectres de fluorescence contiennent les contributions simultanées de différents fluorophores, complexifiant leur identification (Vacher, 2004). Chaque molécule organique fluorescente (fluorophore) présente des spécificités propres se traduisant par un couple de longueurs d'ondes d'excitation-émission (Ex-Em), une intensité de fluorescence maximale, un rendement quantique de fluorescence et une durée de vie de fluorescence. On différencie alors les composés fluorescents de « types » humiques, fulviques et protéiques. La première nomenclature de classification des fluorophores est celle de Coble (1996). Coble (1996) a analysé de grandes quantités d'échantillons environnementaux d'eau douce et marine et a proposé une nomenclature pour chaque pic Ex_{max}/Em_{max} des principales molécules organiques. Le Tableau II.2 présente les maxima de fluorescence de chaque composant identifiés dans les environnements côtiers du monde entier.

Tableau II.2 : Principaux composants fluorescents identifiés dans les environnements côtiers du monde entier.

Reference	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Type/Nature	Environment
Coble, 1996	260	280 – 460	Humic-like	Atlantic and Pacific Oceans
	275	310	Tyrosine-like	
	350	420 – 480	Humic-like	
	312	380 – 420	Marine humic-like	
	275	340	Tryptophan-like	
Chen et al., 2003	< 250	< 350	Tyrosine	Standard Suwannee River fulvic acid (United States)
	250 – 280	< 380	Soluble microbial by product-like	
	> 280	> 380	Humic acid-like organics	
	< 250	> 350	Fulvic acid-like	
Chen et al., 2013	280	330	Tryptophan-like	Yangtze River (China)
	305	385	Marine humic-like	
	350	450	Humic-like	
Timko et al., 2015	< 250	418	Humic-like	Suwannee River Natural Organic Matter (United States)
	300	418	Marine humic-like	
	< 250	454	Humic-like	
	272	504	Humic-like	
Ferretto et al., 2016	250	394	Humic-like (inland)	Rhône River delta and Fos-Marseille marine area (French Mediterranean Sea)
	230	340	Tryptophan-like	
	250	454	Humic-like	
	< 220	< 300	Tyrosine-like (marine)	
	230	342	Tryptophan-like	
Lee et al., 2020	245	450	Humic-like	Masan Bay (Republic of Korea)
	322	405	Humic-like	
	386	450	Humic-like	
Constantino et al., 2020	280	330	Protein-like	Rio Negro and Carú River (Brazil)
	300	421	Humic-like	
	300	426	Humic-like	
	310	420	Humic-like	

II.4.1.5.1 Fluorescence des composés de type substances humiques

Le fluorophore attribué aux substances humiques de type acides humiques est observé pour des domaines de longueurs d'onde comprises entre 330 - 370 nm d'excitation et 420 - 480 nm d'émission. Le fluorophore observé entre 230 - 260 nm d'excitation et 380 - 480 nm d'émission est généralement associé aux substances fulviques (*Mounier et al., 1999* ; *Baker et*

Spencer, 2004). Mobed et al. (1996) ont démontré que la zone de fluorescence des acides humiques se trouvait dans un domaine de longueurs d'onde d'excitation élevées en raison de la présence d'un nombre important de conjugaisons et de composantes aromatiques. À l'inverse, les acides fulviques fluorescent dans des domaines de longueurs d'onde d'excitation plus faibles car ils présentent des groupements donneurs d'électrons. Cela explique le décalage d'intensité de fluorescence des acides humiques vers des longueurs d'onde d'excitation plus élevées que pour les acides fulviques (*Vacher, 2004*). On reportera également que l'intensité de fluorescence des composés de types acides fulviques est généralement plus importante que celle des acides humiques issus d'une même origine. Les acides fulviques présentent une plus faible complexité moléculaire que les acides humiques, ainsi, ils sont moins sujets à des phénomènes d'extinction de fluorescence intramoléculaire (*Chen et al., 2003*).

Le fluorophore associé au matériel de type substances humiques d'origine marine (*Coble, 1996*) a des domaines de longueurs d'onde qui sont compris entre 310 – 320 nm d'excitation et 380 – 420 nm d'émission. Parlanti et al. (1997 ; 2002) relie ce fluorophore aux exsudats issus de la dégradation du phytoplancton et des microalgues en milieu marin, témoignant d'une activité biologique *in situ*. D'autres études ont démontré la présence de ce fluorophore également dans les eaux douces (*Huguet et al., 2010*) et les rejets de station d'épuration des eaux usées traitées (STEP) (*Yamashita et Tanoue, 2003 ; Stedmon et al., 2007*). Stedmon et Markager, (2005) associent ce fluorophore à de la DOM altérée par l'activité microbienne provenant d'une activité microbienne récente.

II.4.1.5.2 La fluorescence des composés protéiques

Deux fluorophores caractéristiques des composés de types protéiques et peptidiques ont été identifiés pour la DOM (*Coble, 1996*). Ils comprennent la fluorescence de trois aminoacides : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine (*Hudson et al., 2007*). Cependant, aucune bande n'est attribuée aux composés de type phénylalanine en raison de son faible rendement quantique, dix fois inférieur à celui de la tyrosine et du tryptophane, ce qui ne permet pas de les détecter dans les milieux aquatiques (*Determann et al., 1994*). Ces fluorophores sont associés à l'activité biologique du milieu car leur intensité est dépendante de l'état de dégradation du matériel organique (*Determann et al., 1998*).

Le fluorophore associé à la tyrosine émet dans des longueurs d'onde de 300 - 320 nm alors que le fluorophore associé au tryptophane émet dans des longueurs d'onde 320 à 380 nm. Tous deux présentent une longueur d'onde d'excitation comprise entre 270 et 280 nm. Ces deux domaines spectraux étant très proches, leur interprétation est parfois difficile. Des effets de superposition

de ces deux bandes ainsi que de possibles interférences avec la fluorescence des substances humiques peuvent survenir, complexifiant la distinction entre les composés de types tryptophane et tyrosine dans les milieux naturels (*Vacher, 2004 ; Huguet, 2007*).

II.4.1.6. Caractéristiques du spectrofluorimètre

Dans ce travail de thèse, les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre FluoroMax Plus. Cet instrument est équipé d'une lampe xénon de 150 W permettant de mesurer la fluorescence à des longueurs d'onde d'excitation de 185 à 850 nm et une détection de spectres d'émission jusqu'à 1650 nm. Le FluoroMax Plus a été choisi pour l'analyse de la FDOM car il représente les performances de pointe dans un modèle de laboratoire pratique, abordable et facile d'utilisation. En effet, il offre la sensibilité nécessaire pour distinguer les fluorophores avec des domaines spectraux proches comme les composés protéiques.

II.4.1.7. Méthodes d'interprétation des spectres de fluorescence

Il existe différentes méthodologies d'interprétation des matrices d'excitation-émission de fluorescence comme le peak-picking ou la fluorescence excitation-emission matrix regional integration (*Chen et al., 2003*). Cependant, l'ensemble des approches précédentes présentent l'inconvénient de reposer sur l'application de fluorophores préalablement identifiés dans les milieux naturels et ne peuvent pas être adaptées à tous les types d'échantillons. Dans l'optique de ne pas omettre de pics de fluorescence et de mieux étudier la fluorescence de pics d'échantillons de diverses origines, de nouvelles approches de traitements ont été proposées. En se basant sur des techniques statistiques adaptées, des algorithmes de décompositions des spectres de fluorescence en trois dimensions ont été développés. Les plus courants sont :

- PARAllel FACtor analysis (PARAFAC) (*Bro, 1997 ; Stedmon et al., 2003 ; Stedmon et Bro, 2008*),
- Self organizing map (SOM) (*Bieroza et al., 2009 ; Cuss et al., 2014 ; Cuss et Guéguen, 2015*),
- Partial last squares régression (*Bieroza et al., 2012*).

PARAFAC est, à ce jour, l'algorithme de traitement le plus couramment utilisé pour définir le nombre de fluorophores, leurs intensités de fluorescence ainsi que les allures spectrales des composants (ou groupements de fluorophores) indépendants contenus dans l'échantillon.

Ainsi, PARAFAC a été choisi comme méthode de traitement au cours de cette thèse afin d'interpréter les spectres de FEEM de la DOM marine.

II.4.2. Analyse moléculaire de la DOM

En raison des multiples sources et des nombreux processus de transformation qu'elle subit, la DOM océanique est un pool de matière complexe, hétérogène, constitué d'une myriade de composés organiques de structure et de poids moléculaire différents, et qui restent pour la plupart (75 %) non identifiés au niveau moléculaire (*Mopper et al., 2007*). Plusieurs techniques existent pour caractériser la DOM dans le milieu marin. Les méthodes globales telles que la spectroscopie de fluorescence permettent d'identifier des groupes de molécules et les méthodes très fines, comme la spectrométrie de masse à haute résolution, donnent la possibilité d'analyser des composés individuels (*Mopper et al., 2007*). Les analyses fines fournissent des informations très pertinentes sur la composition moléculaire de la DOM.

II.4.2.1. La spectrométrie de masse à haute résolution

Des profils détaillés de composition chimique et moléculaire peuvent être obtenus en utilisant des couplages impliquant la spectrométrie de masse (MS). Ces techniques ont la possibilité d'analyser une large variété de molécules (échantillons organiques ou inorganiques, depuis des poussières stellaires jusqu'aux macromolécules biologiques). Les avantages certains de la MS sont sa sensibilité ainsi que sa capacité à détecter individuellement toutes les molécules coexistant en solution (contrairement à d'autres techniques analytiques qui rendent un signal global de l'échantillon). Par conséquent, la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution (HR-MS) est un outil indispensable pour l'analyse de mélanges complexes. Ses caractéristiques de performance offrent des profils de composition détaillés, avec plusieurs milliers d'affectations moléculaires uniques obtenues à partir d'un seul spectre.

Toutefois, il convient de prendre en compte que notre compréhension de la composition moléculaire de la DOM est limitée à la fraction qui peut être isolée et concentrée de l'eau de mer, principalement par ultrafiltration ou extraction en phase solide (*Repeta, 2015*). L'extraction en phase solide (SPE) consiste à faire passer de l'eau de mer filtrée sur une surface solide plus ou moins hydrophobe, puis à éluer et collecter la DOM absorbée. Malgré la diversité des colonnes de SPE disponibles, cette approche concentre sélectivement une fraction de la DOM en fonction de son hydrophobicité, il faut donc garder à l'esprit que SPE-DOM n'est pas représentative du pool total de DOM.

Actuellement, la spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) possède les capacités de performance les plus élevées en termes de résolution et de précision de masse, suivis par les Orbitraps et la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF) (*Tableau II.3, Marshall et Hendrickson, 2008*).

Tableau II.3 : Quelques caractéristiques des principaux HR-MS.

Spectromètre de masse	Gamme m/z	Résolution	Précision de masse
Temps de vol (TOF)	0 – 25 000	10 000	2 - 5 ppm
Trappe électrostatique (Orbitrap)	15 – 4 000	150 000	2 ppm
Résonance cyclonique ionique (ICR)	100 – 10 000	500 000	< 2 ppm

II.4.2.2. Principes de fonctionnement

Pour être détecté, un échantillon doit être vaporisé et ionisé, produisant ainsi des ions en phase gazeuse qui peuvent être séparés selon leur rapport masse sur charge (m/z). L'échantillon généralement liquide ou solide est transformé en gaz dilué par un vide poussé. Pour pouvoir manipuler des molécules en faible densité, il est beaucoup plus facile de les ioniser pour qu'elles réagissent à des combinaisons de champs électriques et/ou magnétiques. Le principe commun à tous les couplages impliquant la spectrométrie de masse est la détection des ions en phase gazeuse très diluée. En général, l'appareillage se compose donc :

- d'un système d'introduction d'échantillon,
- d'une source d'ions qui va permettre l'évaporation et l'ionisation des composés,
- d'un analyseur qui va séparer les composés en fonction de leur rapport m/z ,
- d'un détecteur qui va détecter et compter les ions générant un signal qui, après intégration, aboutira au spectre de masse.

Ce schéma général peut être décliné d'un grand nombre de manières, et peut varier selon le problème analytique donné. En effet, la combinaison de ces systèmes définit les capacités analytiques (pouvoir de résolution et précision de masse) du couplage. Les performances d'un spectromètre de masse sont largement liées aux performances de l'analyseur (gamme de rapport m/z , résolution, vitesse de balayage, précision de mesure de masse, mode de fragmentation, etc.). Tous les analyseurs visent à séparer et mesurer les rapports m/z des ions en phase gazeuse,

mais ils reposent sur des principes physiques différents. La demande en capacités analytiques puissantes est de plus en plus forte ce qui a motivé une évolution rapide et constante de l'instrumentation au cours de ces dernières années. De nouveaux types d'analyseurs plus rapides et plus résolutifs font désormais leur apparition.

II.4.2.3. L'analyseur Orbitrap

La trappe orbitale communément appelée orbitrap utilisée au cours de cette thèse est un analyseur de type piège à ions qui a été développé par Makarov. Depuis sa commercialisation en 2005, l'orbitrap a révolutionné et introduit la spectrométrie de masse à haute résolution dans les laboratoires. L'objectif du développement de l'orbitrap était d'obtenir un instrument de recherche et de routine hautement performant en termes de pouvoir de résolution et de sensibilité (*Zubarev and Makarov, 2013*). En effet, le FT-ICR possède les capacités de performance les plus élevées avec la plus haute précision de masse, la plus forte puissance de résolution et la meilleure sensibilité (*Marshall et Hendrickson, 2008*). Cependant, sa grande taille, sa complexité et son coût d'acquisition et de fonctionnement restreignent son utilisation. Par conséquent, un analyseur plus compact, moins coûteux et plus facile à entretenir avec des performances comparables était souhaité pour compléter le FT-ICR. Cette lacune technologique a donc été comblée par les spectromètres de masse à trappe orbitale (*Makarov et al., 2006 a, b ; Olsen et al., 2005*). L'orbitrap permet de déterminer le rapport m/z d'une molécule (*Figure II.4*).

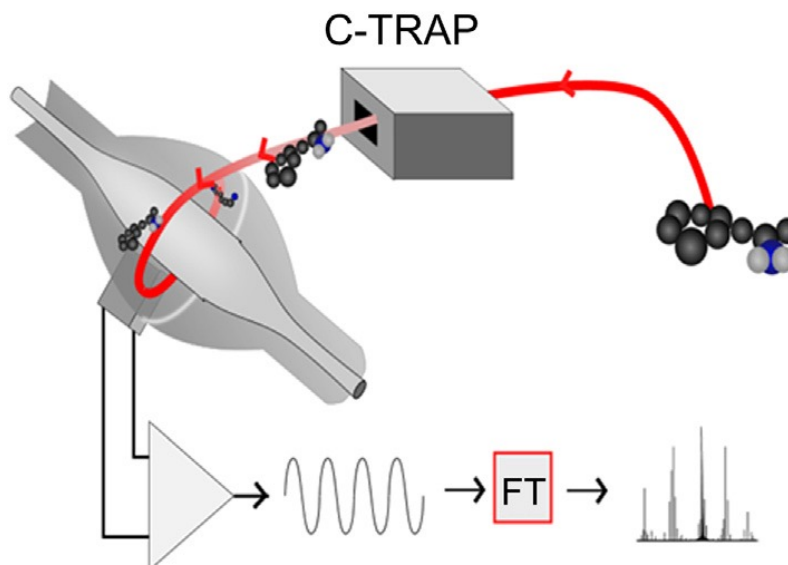


Figure II.4 : Présentation schématique de la technologie orbitrap. L'orbitrap est basé sur des paquets d'ions pulvés, produits par le C-trap, qui sont introduits et capturés dans l'analyseur. Les ions sont maintenus dans un mouvement orbitrap tandis que le champ électrique appliqué maintient les ions dans un mouvement oscillant et produit des signaux vers les plaques réceptrices. Les signaux sont transformés par Fourier en données spectrales de masse (Beck et al., 2019).

Les performances des analyseurs dépendent de trois paramètres :

- La limite de masse : la masse la plus élevée qu'il est capable d'analyser.
- Le pouvoir de résolution : son aptitude à séparer des ions de masses voisines. Les mélanges naturels complexes peuvent contenir plusieurs centaines de milliers de compositions moléculaires avec des différences de masse étroites (Hertkorn et al., 2008). Un pouvoir de résolution élevé est nécessaire pour atteindre une précision de mesure suffisante pour séparer des éléments avec des masses proches.
- La précision de mesure de masse : la validation ou l'identification d'une structure moléculaire dépendra largement de la correspondance entre la masse mesurée et la masse théorique de cette molécule. La précision de mesure de la masse est importante pour une attribution sûre des compositions moléculaires individuelles dans un spectre de masse. Plus la précision de mesure de la masse sera élevée, meilleure sera la certitude de l'interprétation. La précision de mesure de la masse est également liée au degré avec lequel les mesures fournies par les analyseurs sont reproductibles.

Les analyseurs de type orbitrap ont un pouvoir résolutif excellent qui leur permet d'atteindre des résolutions allant jusqu'à 150 000 et des précisions de mesure de masse < 1 ppm pour des temps d'acquisition relativement courts ≤ 8 secondes. La limite de masse peut atteindre plus de 6 000 m/z dans certaines publications scientifiques (*Perry et al., 2008*). L'orbitrap est donc un appareil ayant une haute exactitude sur la masse et une très bonne résolution. Il est alors possible d'identifier de façon précise chaque pic m/z du spectre de masse et d'élucider la structure de la molécule analysée. Cet appareil assure donc une analyse qualitative meilleure que certains autres spectromètres de masse. Il peut également analyser autant de grosses molécules multichargées que de petites molécules et ce avec de meilleures performances que les autres spectromètres.

II.4.2.4. Le spectre de masse

La transformée de Fourier convertit les signaux détectés en spectre de fréquence proportionnel à la masse des ions piégés. Le spectre de masse obtenu après traitement par le spectromètre de masse est un graphique qui représente l'abondance relative (en tant qu'intensité du signal) des ions détectés en fonction de leur rapport m/z. Le spectre de masse est constitué de pics présentés sous forme d'un trait vertical. L'identification des molécules est ensuite possible par interrogation et comparaison des données du spectre de masse avec une base de données contenant une banque de spectres (ThermoFisher, <https://www.thermofisher.com>).

II.4.2.5. Traitement des spectres de masse

Le traitement des données orbitrap comprend le processus d'attribution de la formule moléculaire, l'évaluation de la qualité des données, la sélection des données, la visualisation, et l'exportation. Les approches existantes pour le traitement des données des spectres de masses diffèrent par leur champ d'application, leur performance et leur degré de transparence et d'accessibilité. De nombreux algorithmes et logiciels ont été développés pour le traitement des données de spectrométrie de masse (MS) toutefois un bon nombre d'entre eux se concentre sur des aspects spécifiques du processus d'évaluation et/ou manque de transparence en rendant inaccessibles leurs codes sources sous-jacents (*Kujawinski et Behn, 2006 ; Kunenkov et al., 2009 ; Tziotis et al., 2011 ; Tolic et al., 2017*). Durant cette thèse, un logiciel libre d'accès, transparent et facile d'utilisation nommé UltraMassExplorer (UME) a été utilisé pour le traitement des données. UME s'appuie sur des bibliothèques de formules statiques qui sont utilisées pour faire correspondre les masses aux formules moléculaires. Toutes les bibliothèques

sont basées sur des masses isotopiques exactes compilées par le National Institute of Standards and Technology (*Wieser et Berglund, 2009*) et couvrent presque toutes les formules théoriques de la matière organique naturelle. A l'issue de l'analyse orbitrap, les données obtenues sont sous forme d'une liste validée (étalonnée) de pics contenant des colonnes pour la masse et la magnitude du pic. L'utilisateur doit fournir l'erreur de masse prédéterminée (\pm ppm) qui s'applique à la mesure pour définir les limites supérieures et inférieures de la fenêtre de masse pour chaque affectation de pic. Les compositions élémentaires sont généralement attribuées sous la forme $C_c H_h N_n O_o S_s$, où c, h, n, o et s sont les nombres d'atomes des éléments respectifs. Une vingtaine de filtres sont également disponibles et peuvent être appliqués pour affiner l'attribution des formules moléculaires. Après l'attribution initiale de la formule, des paramètres précieux pour l'évaluation des spectres de masse à haute résolution sont automatiquement calculés par UME : le nombre d'atome de C, H, O, N, P, S, les ratio O/C, H/C et S/C, l'indice d'aromaticité (AI), l'état d'oxydation moyen du carbone (NOCS), le nombre de doubles liaisons équivalentes (DBE).

II.5. Caractérisation des communautés microbiennes

II.5.1. Estimation de l'abondance des microorganismes par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technologie qui a été développée au milieu des années 60 et qui a immédiatement trouvé application dans le domaine biomédical, en immunologie et biologie cellulaire. Elle permet une analyse multiparamétrique à une fréquence de passage de plusieurs milliers de particules (cellules) par seconde. Cet outil permet donc d'analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps. Dans les années 80, la cytométrie a suscité un fort engouement de la part des microbiologistes car elle permet de caractériser, d'énumérer et de trier les cellules à partir de groupes de populations hétérogènes, tout en conservant la viabilité cellulaire (*Steen, 2000*). En microbiologie environnementale la cytométrie en flux est un outil de grand intérêt qui permet à la fois : un dénombrement et une analyse rapide des cellules ; une discrimination des particules en fonction de leur taille (diffusion aux petits angles), de leur structure cellulaire (diffusion à 90°), de leur intensité et couleurs de fluorescence (naturelle ou induite par des colorants fluorescents) et de mettre en évidence l'hétérogénéité à l'échelle d'une population ou d'une communauté (*Vives-Rego et al., 2000*).

Au cours de cette thèse, la cytométrie en flux a été utilisée pour estimer l'abondance des communautés de procaryotes hétérotrophes dans la colonne d'eau et dans les expériences

d'incubation réalisées. L'utilisation de la cytométrie en flux au cours des différentes études a été très avantageuse et a servi de fil conducteur durant toute cette thèse.

II.5.1.1. Marquage des cellules

Les procaryotes hétérotrophes ne sont pas naturellement fluorescents et nécessitent donc une coloration pour pouvoir les différencier des autres particules présentes dans l'échantillon. Le SYBR[®] Green est un colorant spécifique de l'ADN double brin. Le SYBR Green est référencé comme un des meilleurs colorant des acides nucléiques, propriété vraisemblablement due à son rendement quantique élevé, à sa forte affinité pour ces molécules ainsi qu'à sa très forte intensité de fluorescence (*Grégori et al., 2001*).

II.5.1.2. L'instrument BD Accuri[™] C6

L'estimation de l'abondance cellulaire a été réalisée avec le cytomètre en flux BD Accuri[™] C6 (BD Biosciences). Le BD Accuri[™] C6 est un instrument compact, transportable dont les composants sont protégés par une structure rigide complètement fermée. C'est un cytomètre de routine dont la configuration optique est modifiable en fonction des besoins. Le fonctionnement de l'Accuri[™] C6 repose sur trois composantes :

- *Une composante fluïdique* : l'échantillon à analyser est injecté au moyen d'une seringue de précision à travers un capillaire à l'intérieur d'un liquide vecteur appelé le liquide de gaine. Les cellules en suspension sont ensuite centrées par focalisation hydrodynamique grâce au liquide de gaine pour former un flux monodisperse. Ce flux étire l'échantillon et entraîne les cellules les unes à la suite des autres vers une chambre de mesure.
- *Une composante optique* : au niveau de la chambre de mesure, les cellules sont exposées à un faisceau laser bleu (488 nm). Sous l'effet de l'excitation, les cellules vont émettre une fluorescence naturelle (par exemple, celle de leurs pigments) ou induite (colorants), en plus de dévier les photons du laser (diffusion). Les signaux de fluorescence émis par les cellules sont acheminés par un ensemble de miroirs dichroïques et de filtres optiques sur des tubes photomultiplicateurs. La diffusion de la lumière aux petits angles et à 90° est détectée par des photodiodes. Pour chaque particule interceptée par le laser, des signaux de diffusion et de fluorescence sont enregistrés. Le signal de diffusion collecté par une photodiode aux petits angles (< 15°, forward scatter, FSC) par rapport à la direction d'incidence du faisceau laser est en relation avec la taille de la cellule analysée. Le signal collecté à 90° (side scatter, SSC) est en relation avec la forme et la structure interne de la

cellule. Trois signaux de fluorescence fonctions du contenu en molécules fluorescentes naturellement présentes ou ajoutées sont également détectés : la fluorescence verte (~ 530 nm), orange (~ 585 nm) et rouge (> 670 nm). L'accuri C6 est également équipé d'un laser rouge (640 nm) et d'un capteur de fluorescence dédié (~ 675 nm), qui n'ont pas été utilisés pour acquérir les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse.

- *Une composante électronique* : les signaux électriques sont convertis et enregistrés en valeurs digitales en temps réel en mode liste sur un ordinateur relié au cytomètre, en vue d'une analyse ultérieure. Le logiciel BD Accuri CFlow Plus permet le contrôle de l'acquisition des données.

Le logiciel BD Accuri CFlow Plus permet de représenter les résultats de l'acquisition sous forme de cytogrammes (un paramètre optique en fonction d'un autre, du temps d'acquisition ou du nombre d'évènements détectés). Les procaryotes hétérotrophes ont pu être distingués en fonction des différents signaux de fluorescence et de diffusion (*Davey et Kell, 1996 ; Gasol et Del Giorgio, 2000 ; Nebe-von-caron et al., 2000 ; Veldhuis et Kraay, 2000*). Les particules considérées comme procaryotes hétérotrophes étaient inférieures à 2,0 µm (faible FSC), présentaient une faible complexité (faible SSC), émettaient une fluorescence verte (issue des propriétés de fluorescence du SYBR Green lié à l'ADN double brin) et aucune fluorescence rouge (fluorescence de la chlorophylle, *Grégori et al., 2001*).

Si la cytométrie en flux permet d'estimer l'abondance des procaryotes hétérotrophes, elle ne donne toutefois aucune indication sur leur diversité taxonomique. Au mieux, elle permet de distinguer deux groupes selon la quantité d'ADN dans leurs cellules (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.

II.5.2. Approche moléculaire pour l'étude de la diversité microbienne

Les méthodes de biologie moléculaire basées sur des acides nucléiques extraits de communautés microbiennes marines offrent une alternative aux techniques de marquage unicellulaire et se sont révélées extrêmement importantes dans les études sur la composition et la distribution des espèces. Une faiblesse de ces méthodes de biologie moléculaire est qu'elles nécessitent une méthode d'extraction hautement efficace et reproductible, qui délivre des acides nucléiques de haute qualité.

II.5.2.1. Extraction d'ADN

Un large éventail de protocoles d'extraction d'ADN différents est utilisé aujourd'hui pour les analyses des communautés en écologie microbienne aquatique. Il s'agit d'une préoccupation majeure car les différences d'efficacité d'extraction pourraient se refléter dans les analyses de communautés ultérieures, comme cela a été récemment documenté pour les communautés du sol (*Stach et al., 2001*). Dans un premier article de Fuhrman et al. (*1988*), un effort a été fait pour adopter un protocole standard pour l'extraction d'ADN dans des échantillons environnementaux. Aujourd'hui, des versions modifiées de ce protocole sont couramment utilisées lors de l'extraction d'acides nucléiques des eaux marines (par exemple, *Moeseneder et al., 1999 ; Weinbauer et al., 2002*). L'efficacité de l'extraction de l'ADN rapportée par Fuhrman et al. (*1988*) était de 25% à 50% et celle rapportée par Weinbauer et al. (*2002*) était de 20% à 60%. Dans ce travail, le protocole d'extraction d'ADN décrit par Bostrom et al. (*2004*) a été choisi pour sa forte reproductibilité et son efficacité d'extraction moyenne de 92 % pour les échantillons d'eau de mer. Le détail des protocoles d'extraction peut être retrouvé dans l'article 3 (chapitre V, section matériels et méthodes).

II.5.2.2. Amplification de l'ADN extrait par PCR

Le séquençage haut débit continue de rendre l'analyse de la diversité microbienne plus facile et moins coûteuse. Le métabarcoding repose sur une amplification au préalable de gènes ou fragments de gènes PCR (Polymérase Chain Reaction). Par conséquent, le choix des amorces utilisées devient crucial pour tirer parti de la longueur de la séquence et de la couverture rendues possibles par des technologies de séquençage améliorées. Le Earth Microbiome Project (EMP) a proposé des amorces et des protocoles standards, ciblant le gène de l'ARNr 16S, pour permettre des comparaisons de la diversité des procaryotes hétérotrophes entre les échantillons. Les amorces 515F/806R ont été proposées pour maximiser la couverture mondiale des bactéries et des archées tout en fournissant des produits de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) de longueur appropriée pour le séquençage avec les plateformes Illumina disponibles (*Caporaso et al., 2011 ; 2012*). Les critères de sélection de ces amorces PCR pour le séquençage comprennent la couverture élevée des taxons d'intérêt (ici toutes les bactéries et les archées), la capacité de comparer les résultats avec des études antérieures, la précision des abondances relatives et aussi la résolution phylogénétique. Cependant, de nombreuses études ont constaté qu'en utilisant les amorces 515F/806R, certains groupes étaient mal représentés (*Fisher et Triplett, 1999 ; Beman et al., 2011 ; Cram et al., 2015*). Parada et al. (*2016*) ont alors proposé

une nouvelle paire d'amorce 515F-Y/926R. Cette dernière englobe les régions hypervariables V4 et V5, tandis que 515F-Y/806R ne comprend que la V4. Par conséquent, la paire d'amorces 515F-Y/926R donne un produit plus informatif de longueur appropriée (compte tenu des capacités de la méthode de séquençage la plus couramment utilisée, Illumina MiSeq 2 × 250 paires de bases ou 2 × 300 paires de bases). Par ailleurs, ce couple d'amorce englobe la région ciblée par les amorces EMP, ce qui facilite les comparaisons. Parada et al. (2016) ont montré que la paire d'amorces 515F-Y/926R avait une meilleure couverture des taxons marins extrêmement communs que les amorces EMP originales (515F-C/806R). Les amorces promues par Parada et al. (2016) donnent donc une image précise et résolutive des communautés bactériennes et archéennes marines, au regard de leurs proportions respectives dans la communauté procaryote, et ont été choisies pour ce travail de thèse. Le détail des protocoles d'amplification peut être retrouvé dans l'article 3 (chapitre V, section matériels et méthodes)

II.5.2.3. Séquençage haut débit des produits de PCR

Le séquençage d'ADN consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La première technique de séquençage est la méthode Sanger, apparue en 1970. Elle a permis notamment de séquencer le génome humain. Cependant, cette méthode était longue et coûteuse, c'est pour cette raison que de nouvelles méthodes de séquençage ont été développées. Ces méthodes partagent trois améliorations majeures par rapport au séquençage Sanger :

- Au lieu d'un clonage moléculaire des fragments d'ADN suivi par l'introduction dans des cellules hôtes et l'isolement de chaque clone individuellement, une banque de séquences qui contient l'ensemble des fragments est préparée directement dans un tube (*in vitro*).
- Alors que les appareils développés pour le projet de séquençage du génome humain n'étaient capables d'effectuer que quelques centaines de réactions de séquençage Sanger en parallèle, les séquenceurs nouvelle génération peuvent faire des millions voire des milliards de réactions de séquençage en parallèle.
- Les technologies de séquençage de nouvelle génération ne nécessitent pas de séparation des fragments par électrophorèse ; la détection des nucléotides incorporés par la polymérase est faite directement après chaque cycle d'incorporation.

Au début, différentes technologies étaient en concurrence, mais grâce à une évolution plus rapide de la qualité des données, du débit et de la longueur de lectures, Illumina a progressivement renforcé sa position sur le marché et a aujourd'hui un quasi-monopole. Dans

ce travail de thèse, les produits de PCR des échantillons par le séquençage d'une banque d'amplicons ciblant l'ADN 16S ont été analysés par la technique Illumina MiSeq 2*300 paires de bases (pb) par la société Eurofins (Allemagne).

Le principe de séquençage par la technique Illumina MiSeq est décrit dans la Figure II.5. Les molécules d'une banque nouvelle génération contiennent des adaptateurs aux extrémités qui ont deux fonctions principales : l'accrochage et l'amplification sur une cellule flux (*flow cell*). Il s'agit d'une plaque en verre où les réactions de séquençage et la visualisation des nucléotides incorporés ont lieu. Les fragments d'ADN à séquencer sont dénaturés et les molécules simple brin vont alors s'hybrider au niveau des différents puits présents sur la cellule de flux, grâce à la complémentarité de leurs adaptateurs avec les oligonucléotides attachés à la cellule de flux. 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 antisens (*forward*) sont liés à la surface du puits. Pour amplifier le signal, la PCR est répétée pendant plusieurs cycles, ce qui aboutit à la formation d'un « *cluster* » de milliers de molécules identiques au brin matrice d'origine. Cette étape d'amplification est nécessaire à l'obtention d'un signal suffisamment important au moment du séquençage. À l'issue de cette étape, des amorces de séquençage s'hybrident à tous les brins de tous les clusters, et servent de point de démarrage au séquençage. Durant chaque cycle de séquençage, un nucléotide qui contient un fluorophore qui lui est propre est ajouté au brin d'ADN en formation. Après l'incorporation de chaque nucléotide, un laser excite le fluorophore et un scanner optique balaye le puits pour identifier les différentes couleurs des fluorophores qui représentent les nucléotides incorporés dans chaque cluster. Cette information optique est convertie en base nucléique pour brin d'ADN en formation. À la fin de chaque cycle, le fluorophore est retiré et le cycle suivant se poursuit jusqu'à atteindre la longueur de séquence souhaitée. Chaque puits peut produire 250 millions de séquences d'une longueur comprise entre 250 et 500 pb.

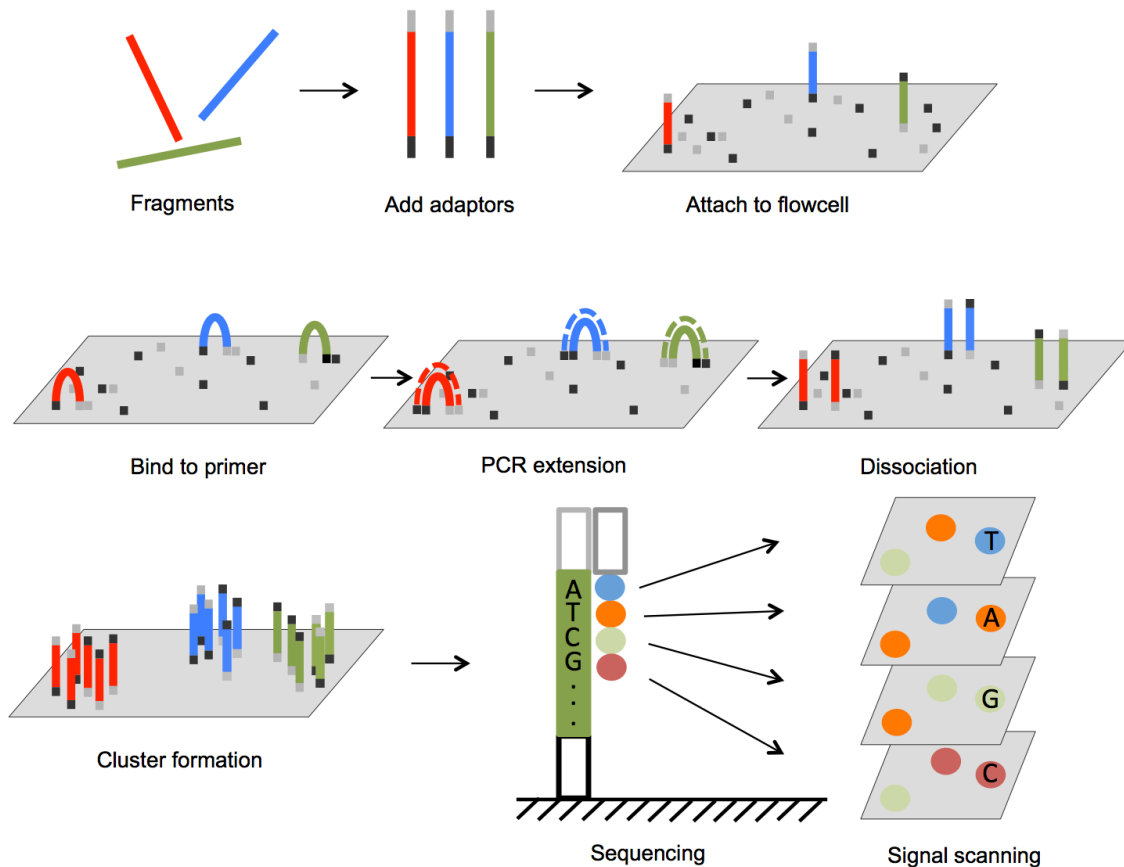


Figure II.5 : Présentation des principales étapes de base du séquençage par la technique Illumina MiSeq. Source : <https://www.intechopen.com/chapters/49419>.

II.5.2.4. Traitement bio-informatiques des séquences ADN

Les données brutes de séquençage obtenues sont ensuite analysées sur plusieurs niveaux à l'aide d'un ensemble de logiciels bio-informatiques. Au cours de la première étape, les données brutes de séquençage sont décryptées en séquence nucléotidiques, appelées séquences lues ou « reads ». Pour chaque échantillon, des dizaines de milliers de reads sont produits ce qui nécessite des outils capables de prendre en charge cette quantité de séquence.

Historiquement, l'analyse des données de séquençage aboutissait généralement à une clusterisation en OTU (Operational Taxonomic Unit) correspondant à des groupes de séquences différant le plus souvent de moins de 3%. La caractérisation des échantillons par les OTUs servait de base pour les analyses plus approfondies, où les OTUs étaient 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, Amplicon Séquence Variant) à partir des données de séquençage Illumina sans imposer des seuils de dissimilarité arbitraires qui définissent les OTU (Callahan *et al.*, 2016, 2017).

L'objectif de la méthode par ASV est de corriger le bruit introduit dans les fragments séquencés plutôt que de clustériser les séquences proches. Le principe est le suivant : les séquences lues appartiennent initialement toutes au même groupe. La diversité des séquences lues au sein de ce groupe est ensuite comparée à la diversité attendue uniquement en présence d'erreur de séquençages. Si elle est trop grande, le groupe initial est divisé en sous-groupes plus homogènes. Le processus est répété dans chacun des sous-groupes jusqu'à obtenir des groupes homogènes, c'est-à-dire correspondant à une « vraie » séquence lue et aux variations autour de celle-ci engendrées par les erreurs de séquençage. Les méthodes ASV sont capables de traiter des séquences qui diffèrent même d'un seul nucléotide et évitent le regroupement basé sur la similitude. La méthode par ASV a montré une meilleure sensibilité et une spécificité aussi bonne voire meilleure que les méthodes par OTUs, ce qui doit permettre une meilleure interprétation écologique (Callahan *et al.*, 2016, 2017 ; Needham *et al.*, 2017). Le package en libre accès DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm, Callahan *et al.*, 2016) sur R a été utilisé pour le traitement des données de séquençage des amplicons du gène de l'ARNr 16S des échantillons présentés dans l'article 3 (chapitre V). Le package DADA 2 a été utilisé pour l'ensemble du traitement des données de séquençage suivant les étapes suivantes (détaillées ci-après) : évaluation de la qualité des séquences, filtration, déréplication, dénoising, assemblage des séquences reverse et forward, suppression des chimères, construction d'une table d'ASVs, et assignation taxonomique (Figure II.6).

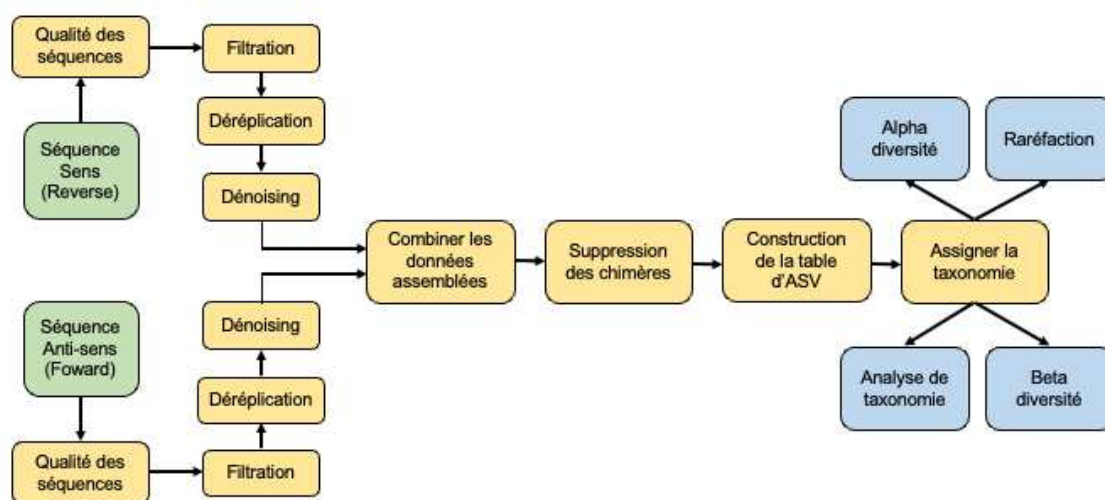


Figure II.6 : Schéma conceptuel du traitement des données de séquençage des amplicons du gène de l'ARNr 16S bactérien avec DADA2. En vert : les données brutes du séquençage ; en jaune : les étapes de traitement des données sous DADA2 ; en bleu : les analyses de diversité et les analyses statistiques complémentaires.

Analyse de la qualité des séquences : le séquençage en masse génère d'immenses quantités de données avec des millions de séquences ou lectures. Néanmoins, cette abondance d'information ne doit pas se faire au détriment de la qualité (Faure et Joly, 2016). En effet, ces nouvelles technologies ne sont pas exemptes d'erreurs de lecture et les adaptateurs qui peuvent être utilisés lors du processus de séquençage doivent être retirés. Lors de l'étape d'évaluation de la qualité les séquences de trop faibles qualités (quality score < 20%) ont été tronquées en maintenant tout de même un chevauchement approprié (> 30 bases).

Filtration : l'étape de filtration consiste à retirer les séquences trop courtes (< 150 bases) et les fractions de séquences correspondant aux adaptateurs.

Déréplication : pendant la déréplication, nous condons les données en regroupant toutes les séquences lues identiques, ce qui réduit considérablement les temps de calcul ultérieurs.

Denoising : L'approche inverse du clustering est le denoising qui est proposé par DADA2 (Callahan et al., 2017). L'objectif est de corriger les erreurs de séquençage en se basant sur des modèles d'erreurs construits en utilisant des modèles paramétriques sur les données de séquençage.

Assembler les séquences reverse et forward : jusqu'à cette étape les séquences d'échantillons dans les lectures reverse et forward ont été déduites indépendamment. Cette étape permet de fusionner ces séquences inférées, en éliminant les paires de lectures qui ne correspondent pas.

Suppression des chimères : les chimères sont des séquences d'ADN uniques issues de plusieurs séquences parentes qui peuvent exister dans les lectures de séquençage en raison de biais d'amplification. Lorsqu'une séquence est incomplètement amplifiée, l'amplicon incomplet amorce l'étape d'amplification suivante, produisant un amplicon parasite. Le résultat est une séquence lue qui est la moitié d'une séquence d'échantillons et la moitié d'une autre. La fonction removeBimeraDenovo permet d'identifier et de supprimer les séquences chimères.

Construction d'une table d'ASVs : comme décrit précédemment l'approche la plus communément utilisée était la définition d'OTUs qui repose sur un seuil d'homologie de séquences représentant la limite au-delà de laquelle deux séquences appartiendront à deux OTUs distinctes. Plus récemment de nouvelles approches génèrent des ASVs ; une seule variation nucléotidique se traduisant par un nouvel ASV. En comparaison aux OTU, les ASVs présentent divers avantages, tout particulièrement la possibilité de comparer des jeux de

données issus de différents travaux de recherche (*Callahan et al., 2017*). La fonction `makeSequenceTable` de DADA2 permet de générer cette table d'ASVs.

Affiliation taxonomique : l'affiliation taxonomique a été réalisée en comparant les ASVs à la base de données de séquences du gène de l'ARNr 16S SILVA SSU v.138.1 (*Pruesse et al., 2007 ; Quast et al., 2013*). Les séquences classées comme mitochondries ou chloroplastes ont été supprimées de l'ensemble de données. Les contrôles négatifs d'extraction et d'amplification ont été séquencés, en cas de contamination, les groupes amplifiés ont été retirés de l'ensemble de données des autres échantillons.

L'analyse post-séquençage et le traitement bio-informatique 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 raréfiées au même nombre de séquences par échantillon, qui généralement, 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 analysées. Dans le cadre de ce travail de thèse, comme le nombre de séquences entre les échantillons était relativement similaire, les données ont été raréfiées au nombre de séquences de l'échantillon avec le moins de séquences.

II.6. Analyses statistiques des données

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel R et l'interface R studio (R Core Team, 2022). 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 dans le Tableau II.4.

Tableau II.4 : Description des outils statistiques et des packages utilisés durant cette thèse

Description	Détails	Références/ packages
STATISTIQUES UNIVARIÉES		
Données paramétriques		
Test de Levene	Tester l'homoscédasticité des variances	
Test de Shapiro	Tester la distribution normale des valeurs	
ANOVA (ANalysis Of VAriance)	Tester la significativité des différences entre des groupes de valeurs	Package <i>rstatix</i>
Test de Tuckey HSD	Test post-hoc de comparaison deux à deux	
Données non-paramétriques		
Test Kruskal-Wallis	Tester la significativité des différences entre des groupes de valeurs	Package <i>rstatix</i>
Test de Spearman	Test de corrélation pour déterminer les relations entre les différentes variables biotiques et abiotiques mesurées	
Test de Wilcoxon (ou de Mann-Whitney)	Test de comparaison de moyennes de deux échantillons indépendants ou appariés	Package <i>vegan</i> (Oksanen et al., 2013)
STATISTIQUES MULTIVARIÉES		
Analyse PCoA (« Principal Coordinates Analysis »)	Permet de représenter la dissimilarité inter-objets dans un espace euclidien de faible dimension. Plutôt que d'utiliser des données brutes, la PCoA prend en charge une matrice de	Package <i>phyloseq</i> , <i>ecodist</i> , <i>ape</i> , <i>vegan</i>

(dis)similarité qui peut être établie selon différentes méthodes :

Distance Unifrac

Unifrac mesure les dissimilarités inter-objets en intégrant dans le calcul la proportion de chaque organisme et les distances phylogénétiques entre les organismes observés.

Distance de Bray Curtis

Bray Curtis mesure les dissimilarités inter-objet en se basant uniquement sur la proportion de chaque organisme.

PERMANOVA
 (“PERMutational ANalysis Of the Variance”)

Tester statistiquement si les différences observées entre 2 groupes ou plus sont significatives. C’est un test robuste pour les données écologiques mais qui reste sensible à l’hétérogénéité de la variance entre les groupes.

INDICES

Indice de Shannon

Diversité alpha

Package *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) et *vegan* (Oksanen et al., 2019)

REPRESENTATIONS GRAPHIQUES

Heat trees

Package *metacoder* (Foster et al., 2017)

Volcano plot

Package *dplyr*

Diagramme Van Krevelen

Package *ggplot2*

Barplot, scatterplot etc..

Package *ggplot2* et *ggpubr*

CHAPITRE III.

EVALUER LA VARIABILITÉ SPATIO- TEMPORELLE DES PROPRIÉTÉS DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE

III.1. Avant-propos

Les zones côtières sont exposées à des changements rapides des conditions environnementales et à de fortes pressions humaines. Dans ces milieux, la DOM peut provenir de nombreuses sources allochtones, autochtones et anthropiques. Ces apports peuvent varier dans le temps et dans l'espace, modifier le fonctionnement des écosystèmes et contribuer à des changements dans les compartiments biologiques et chimiques des milieux côtiers.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'hétérogénéité spatio-temporelle des propriétés de la DOM dans un environnement côtier sous influence anthropique contrastée. Ces propriétés incluent la réactivité de la DOM vis à vis du vivant, correspondant au fonctionnement écologique de la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique. Pour cela, il était nécessaire de valider une approche méthodologique permettant d'étudier l'effet des propriétés des substances dissoutes sur la croissance des procaryotes hétérotrophes.

Les procaryotes hétérotrophes sont les principaux consommateurs de DOM. Ils sont à la base de son devenir et contribuent à sa dynamique en milieu marin (*Cole, 1999 ; del Giorgio et Cole, 2000 ; Stocker, 2012 ; Våge et al., 2018 ; Zoccarato et al., 2016*). Ainsi, l'étude de la croissance des procaryotes hétérotrophes est essentielle dans la recherche en écologie car elle fournit les données nécessaires à la construction de budgets et de modèles décrivant le fonctionnement de l'écosystème (*Witek et al., 1997 ; Tett et Wilson 2000 ; Miki et Yamamura, 2005 ; Zoccarato et al., 2016 ; Våge et al., 2018*). Par conséquent, il existe de nombreuses méthodes d'estimation de la croissance des procaryotes hétérotrophes qui sont implémentées en permanence. Les expériences de dilution (*Landry et Hassett, 1982*), qui permettent de diminuer la pression de

prédation et la compétition pour les ressources, ont été développées à l'origine pour mesurer la production et la mortalité par broutage du phytoplancton (*Landry et Hassett, 1982 ; Shinada et al., 2000*). Plus tard, la technique de dilution a été adaptée pour estimer les taux de croissance et de mortalité des bactéries (*Ammerman et al., 1984 ; Murrell et Hollibaugh, 1998 ; Anderson et Rivkin,; Zoccarato et al., 2016*). L'utilisation d'expériences de dilution nécessite tout de même de prendre en compte les biais qu'elles peuvent entraîner. Il est également essentiel de garder à l'esprit que les expériences de dilution modifient considérablement les conditions *in situ*. Tout d'abord, dans les conditions expérimentales, les brouteurs de plus de 0,7 μm et les bactéries attachées aux particules sont éliminés par filtration donc les communautés de procaryotes hétérotrophes sont transitoirement soumises à un contrôle *bottom-up* prédominant. Or, dans l'environnement naturel, les communautés microbiennes sont façonnées, parfois essentiellement, par les pressions *top-down* liées à la prédation (*Fuhrman et Hagström, 2008 ; Silva et al., 2019*). Deuxièmement, en émettant l'hypothèse que les différentes communautés microbiennes prélevées dans le milieu naturel sont matures et stables, dominées par des stratégies K et avec des stratégies r présents dans la biosphère rare, les expériences de dilution perturbent la structure de la communauté en sélectionnant préférentiellement les stratégies r. En effet, dans les conditions expérimentales, la pression *top-down* est éliminée par filtration et la dilution diminue la compétition pour les ressources nutritives. Ces deux conditions sont connues pour favoriser la croissance d'espèces opportunistes (*Odum, 1969 ; Pianka, 1970 ; Logue et al., 2016*), ce qui, dans le cas d'une eau prélevée dans un écosystème oligotrophe soumis à d'importantes pressions de compétition et prédation, favorise les réponses de la biosphère rare aux conditions expérimentales. Les dynamiques microbiennes observées dans les expériences de dilution ne permettent donc qu'une représentativité limitée de la situation réellement observable *in situ*. Outre la méthode de dilution il existe aussi la méthode de préconcentration de la communauté, régulièrement utilisée pour des études de biodégradation. Elle consiste à préconcentrer la communauté de procaryotes hétérotrophes puis à la remettre en suspension dans une eau filtré sur 0,2 μm contenant les substances dissoutes d'intérêt (*Martinot et al., 2023*). A l'inverse de la méthode de dilution, cette méthode vise à maintenir une densité de cellules similaire à celle observable *in situ*, sans dilution, et permet de garder les conditions naturelles de compétition entre les organismes. Cependant, la tension d'aspiration créée lors de la filtration pour la préconcentration des communautés pourrait lyser les cellules et ainsi modifier la structure de la communauté, notamment au sein de la biosphère rare.

Compte tenu des avantages et inconvénients de ces deux approches, la méthode de dilution a été choisie pour ce travail de thèse. La première étude présentée ci-après avait pour objectif de l'adapter pour réaliser des expériences apparentées à des transplantations de communautés microbiennes, et d'évaluer sa pertinence pour comparer la réactivité biologique de différents pools de DOM (article I).

III.2. An effect-based method to evaluate spatio-temporal variations of coastal marine DOM properties

Clara Dignan^{1*}, Véronique Lenoble¹, Olivier Pringault², Benjamin Misson¹

¹Université de Toulon, Aix Marseille Univ., CNRS, IRD, MIO, Toulon, France

²Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, Marseille, France

* Correspondence: clara.dignan@univ-tln.fr

Article soumis (aout 2023) dans Journal of Marine Science and Engineering.

III.2.1. Abstract

Marine dissolved organic matter (DOM) is a key component of the global carbon cycle. While marine DOM properties are usually characterized by chemical approaches, an effort to integrate its variations in an ecological perspective is needed. Heterotrophic prokaryotes being the main consumers of marine DOM, targeting their responses to varying DOM properties provides an effect-based characterization of DOM properties. Dilution experiments of natural marine prokaryotic assemblages were used to assess the spatio-temporal heterogeneity of DOM properties in the coastal environment through its potential to stimulate heterotrophic prokaryotic growth. Reduced top-down pressures allowed to repeatedly evidence a stronger bottom-up stimulation potential of heterotrophic prokaryotes' net growth with DOM collected in harbours under strong human and continental influence compared to DOM collected in more open coastal sites. Shedding the light on high spatial heterogeneity of DOM properties that corresponded only partly to dissolved organic carbon concentrations, this experimental approach represents a simple and reproducible method to improve our understanding of the marine DOM cycle.

Keywords: Carbon cycle; dissolved organic matter; heterotrophic prokaryotes; growth stimulation potential; coastal ecosystem; Mediterranean sea

III.2.2. Introduction

Marine dissolved organic matter (DOM) represents a dynamic component in the interactions between geosphere, hydrosphere and biosphere and, as such, has the potential to influence the global carbon cycle (*Farrington, 1992*). Heterotrophic prokaryotes (HP) are considered as the major consumers and mineralizers of DOM in the ocean, thus initiating the microbial loop (*Azam, 1998*). Forty PgC are recycled each year by the microbial loop which demonstrates that HP represent a very dynamic compartment in global biogeochemical cycles. Prokaryotic DOM uptake induces different processes, assimilation and mineralization of DOM being two essential processes in the marine DOM cycle (*Duclow et al., 2002*). Their relative contributions are influenced by DOM properties (*Amon and Benner, 2001*).

In coastal areas, the ecosystem is exposed to rapid changes in environmental conditions and human pressures. Numerous studies have also demonstrated that primary production by phytoplankton is stimulated in coastal areas feeding the base of the heterotrophic food web (*Borum et al., 1996; Cloern et al., 2014*). Interestingly, Coclet et al. (*2019, 2020*) observed the

selection of prokaryotic taxa adapted to a greater availability of nutritive resources in the most enclosed and chemically contaminated sites of an urbanized Mediterranean bay, suggesting intriguing trophic responses of HP to coastal human influences. Considering the human footprint on the Mediterranean Seashoreline (*UNEP Mediterranean Action Plan and Plan Bleu, 2020*), a better evaluation of human influence on marine DOM and its cycling appears of particular importance. For that purpose, it is required to get a simple and reliable method to evaluate the effect of spatio-temporal variations of DOM properties on the heterotrophic growth in the highly variable coastal area.

Several chemical and biological methods exist to assess the effect of DOM properties on heterotrophic microorganisms. Biological methods allow measuring bacterial production and bacterial growth, using the incorporation of radiolabelled tracers into stable macromolecules, in particular DNA, RNA, proteins or phospholipids. The main drawbacks of these techniques are i) they require special equipment for the use of radioactive or stable isotopes and ii) they involve the use of several conversion factors that are not easy to estimate accurately (*Robarts, 1998*). Among the chemical methods, the measurement of dissolved organic carbon (DOC) consumption by heterotrophic microorganisms is the most widely used, but it has several drawbacks, particularly for its application to the ocean environment (*Volk et al., 1994*). Indeed, the low concentrations of DOC observed in the ocean, especially in oligotrophic area, require long incubation times of several days to observe a significant consumption, even with highly precise equipment.

In this study, we propose a simple, rapid and reproducible method to compare the effect of DOM properties on the growth of heterotrophic prokaryotes from different water samples. The method is based on the potential of the pool of dissolved substances to stimulate HP growth in the absence of significant top-down pressure. It consists in exposing natural microbial communities to various DOM pools in dilution experiments (also referred to as seawater culture) (*Ammerman et al., 1984*) with short-term growth monitoring by flow cytometry. The method requires very few manipulations and is based on ecological responses, with the use of natural complex communities. It was used for a first assessment of the spatial heterogeneity of dissolved substances in the coastal North-Western Mediterranean Sea. Based on previous studies, we hypothesized that DOM of the enclosed harbours within the strongly urbanized and land-connected Toulon Bay could sustain more efficiently the heterotrophic base of the marine planktonic foodweb. We repeatedly observed a stimulation of HP growth with the water of the harbour compared to more open coastal areas. This difference in biological responses only

partly corresponded to DOC variations, proving the usefulness of this easy-to-use method to complement classical chemical characterization of DOM.

III.2.3. Materials and Methods

Two different water bodies were considered on the French coast of the NW Mediterranean Sea: (i) enclosed waters from a large harbour within the strongly urbanized and land-connected Toulon Bay (further referred to as H), and (ii) open coastal waters under little anthropogenic and continental influences sampled at the mouth or outside from the bay (furthered referred to as O). Toulon Bay was chosen because of its numerous human activities, resulting in chemical contaminations gradients and associated HP abundance and diversity gradients previously observed in the water column on a restricted geographical scale (*Coclet et al., 2019; Layglon et al., 2020, Paix et al., 2021*). Both areas were sampled at three distinct dates (March, July and November, 2020) to presumably cover different seasonal variations in water composition, in terms of both DOM pool and prokaryotic community composition. Although the comparison between an enclosed urbanized station and a more open to the sea station was always preserved, the COVID-19 outbreak forced us to choose different sampling stations at the different sampling dates (*Figure III.1*).



Figure III.1: Location of the sampling stations. H: Harbour area under high anthropogenic and continental influences. O: open area under low anthropogenic and continental influences. Mar, jul and nov: sampling campaigns of March, July and November, respectively.

To avoid any contamination during the sampling and the experiments, all the material used was previously washed three times with Milli-Q water, then with 10% (v/v) hydrochloric acid (HCl, Analytical Grade, Fisher) and finally rinsed three times with Milli-Q water. The material was then conditioned with the target sample. For each sample, 2L of surface water (-1 m) were collected with a van Dorn horizontal sampler and transferred in fluorinated ethylene propylene bottle (FEP, Nalgene). Samples were brought back in the lab in a cool box and processed within half a day in order to avoid any major change in dissolved substances properties or prokaryotic communities.

The initial quantity of DOM was estimated at each site and for each sampling date by measuring DOC concentrations. For that, 24 mL samples filtered through a 0.2 μm PES syringe filter were collected in previously conditioned glass tubes and stored at 4°C. DOC concentrations were determined by high temperature catalytic oxidation using a Shimadzu TOC-VCSH carbon analyser with an accuracy of 1.2 μM . Prior to oxidation, samples were acidified with 2 M high purity HCl and purged for 3 minutes with O₂ to remove inorganic carbon. In order to obtain satisfactory analytical precision ($\pm 1\%$), up to 5 repeated injections were performed. Every 8 samples, the system blank was measured with Milli-Q water and the operation of the instrument was verified by comparing data with DOC Consensus Reference Material (SUPER-05) (*Hansell, 2005; Louis et al., 2009*).

For each water sample, a 0.2 μm mixed cellulose esters membrane (Whatman, 47 mm) was rinsed with 100 mL of 10% (v/v) hydrochloric acid (HCl, Analytical Grade, Fisher) and 1L of Milli-Q water to avoid any significant contamination of the filtrate. Then, 500 mL of seawater was filtered through to isolate the dissolved substances' pool in the filtrate. Similarly, a glass fibre filter (GF/C, Whatman, 1.2 μm , 47 mm) was calcinated (450°C, 6h) before being rinsed with Milli-Q water and the targeted sample. Then, 100 mL of raw seawater was filtered to isolate the free-living HP community in the filtrate while removing most of the potential grazers. Dilution experiments were then conducted by exposing each isolated HP community to each isolated dissolved substance pool, resulting in 4 experimental conditions at each sampling date (*Figure III.2*). Because of a conservation issue after the July sampling campaign, we were unable to use the community from H in the incubation experiments. At this date, only the data with the community from O could be acquired.

The different experimental conditions were performed in triplicate. For each replicate, 54 ml of isolated dissolved substances ($< 0.2 \mu\text{m}$) was inoculated with 6 ml of free-living HP ($< 1.2 \mu\text{m}$) for 48 h at 20°C in a 60 ml FEP bottle (*Figure III.2*). These incubations were carried out under conditions promoting HP growth (removal of most of the grazers, reduced competition for

ressources and viral pressure by dilution) and inhibiting any fresh DOM production by phytoplankton production (darkness). Diluting the prokaryotes allowed us to expose them to a large majority of dissolved substances originating from another water sample, without manipulating them too much. This dilution also maximized the analytical precision of the growth estimations while establishing more homogeneous competition and growth conditions between the different incubations.

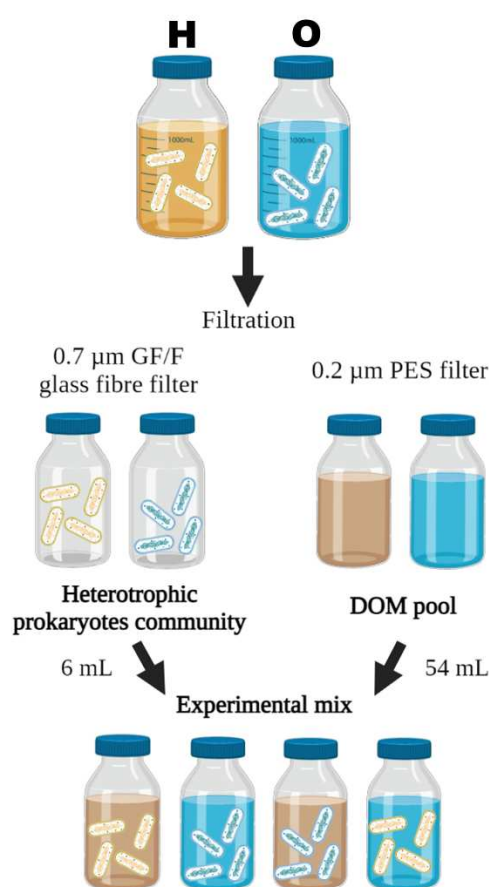


Figure III.2: Schematic representation of the experimental design. At each sampling date, two seawater samples were taken from two contrasted stations. The heterotrophic prokaryotic communities and the pool of dissolved substances were isolated by filtration through 0.7 µm and 0.2 µm filters, respectively. Experimental mixtures were then made by exposing each community to each pool of dissolved substances, in triplicates.

To measure bacterial growth, 1 mL subsamples were taken from each bottle at the initial and final time of incubation, fixed with 0.25% glutaraldehyde (final concentration) and frozen at -80°C until further analysis. After thawing, samples were stained with SYBR Green (1X final

concentration) for 15 minutes in darkness and heterotrophic prokaryotes were counted with an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). Cells considered as HP were smaller than 2.0 μm Fluoresbrite® YG Microspheres (Polysciences Inc.), exhibited low complexity (low SSC), emitted green fluorescence and no red fluorescence (*Grégori et al., 2001*). Data were acquired using BD Accuri CFlow Plus software and HP abundances were expressed as numbers of cells per mL (cell.mL^{-1}). HP abundances were used to calculate net bacterial growth ($\text{cell.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$) by subtracting initial abundances from final abundances and dividing by incubation time (48h).

III.2.4. Results and discussion

In situ variability showed that DOM quantitative properties varied from a spatial but also temporal point of view. The DOC concentration varied between 65.8 and 112.8 μM (*Figure III.3*). On the basis of the sampling campaigns of March and July, DOC concentration tended to significantly increase in the harbour when compared to the open area ($p\text{-value} < 0.05$). Human activities could also contribute to higher DOC concentrations in the harbor area through substantial anthropogenic DOC (ADOC) inputs (*Sachse et al., 2005; Wen et al., 2021*). Although the organic contamination of the water column has not been documented yet in Toulon Bay, the strong organic contamination recorded in the sediments (*Misson et al., 2016; Wafo et al., 2017*) and the contamination of the water by sediment resuspension (*Guigue et al., 2017; Layglon et al., 2022*) do not let any doubt about its occurrence. However, in November, no significant difference in DOC concentration was demonstrated between the harbour area under high anthropogenic pressure and the open area under low anthropogenic pressure, suggesting a temporal variability in human influence on DOM quantitative properties.

Significantly higher DOC concentrations were observed in July relative to March for both sites ($p\text{-value} < 0.05$), while DOC concentrations in July and November were not significantly different ($p\text{-value} > 0.05$). With average concentrations of 71.8, 101.7 and 104.7 μM in March, July and November, respectively, our data are in good agreement with the annual cycle of the DOM in surface waters of the Mediterranean Sea (*Copin-Montégut et al., 1993; Avril, 2002; Pujol-Pay et al., 2003*).

With a maximal increase of 34.9 μM for H and 30.9 μM for O, the temporal variability in DOC concentration appeared higher than the spatial one at a given date (maximal significant spatial difference of 11.9 μM observed in March). This suggests a globally higher influence of temporal processes than spatial heterogeneity of sources and water residence time on DOC concentration. Such trend suggests an important control of phytoplanktonic growth and continental inputs on

quantitative properties of DOM at rather large scale in the coastal area, in agreement with previous observations on phytoplanktonic dynamics in the studied area (*Delpy et al., 2018*).

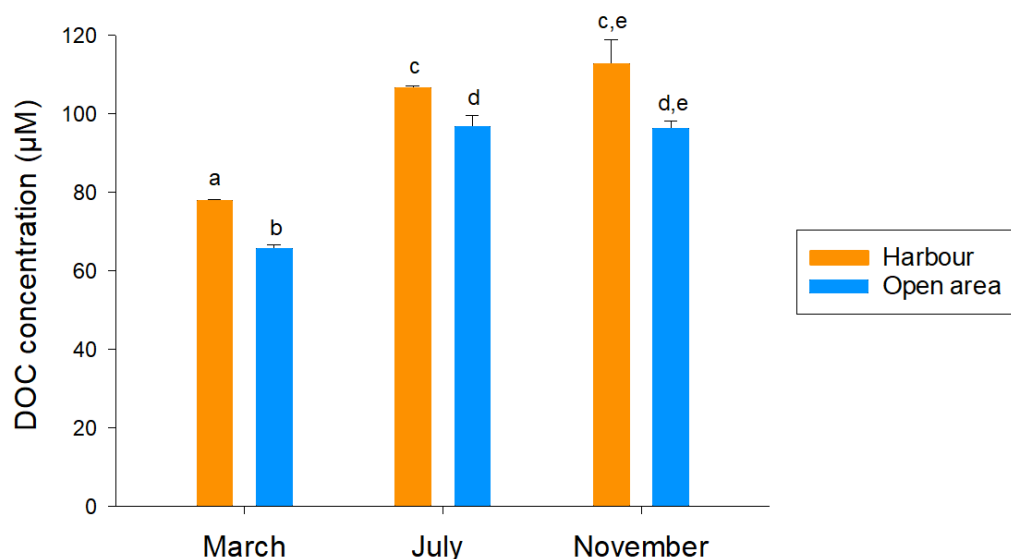


Figure III.3: DOC concentration in the sampled waters for each campaign. Error bars represent standard error calculated from replicated measurements. Letters above error bars represent the result of Tukey multiple comparisons, the absence of common letters indicating a significant difference (p -value < 0.05).

The dilution experiments showed a significant net growth after only 48h of incubation (*Figure III.4*). HP growth was always significantly higher with dissolved substances of the harbour area, regardless of HP community origin and sampling date. This systematic difference in HP growth suggests that the harbour area hosted more dissolved substances that have a high growth-stimulating potential than open coastal areas under low anthropogenic influences. Based on our observations, heavily anthropized coastal environments such as harbour could be considered as hotspots for heterotrophic secondary production. In March and July, the higher DOC concentration in harbour area could be responsible for the differences in growth stimulation observed. However, significantly higher HP growth can be observed without a significantly higher DOC concentration such as in November where no significant difference in DOC concentration was observed between sites. Considering similar competitive and top-down pressures in all experimental conditions, this observation suggests that our experimental approach could be able to differentiate DOM pools based on their potential to support heterotrophic growth at the base of the marine planktonic foodweb, while conventional chemical measurement hardly do so. While previous work monitored HP growth in

experimental approaches to decipher its main controls, it highlighted the predominant influence of grazing by comparing filtered vs. non filtered conditions (*Silva et al., 2019*). By a systematic dilution of filtered HP community, our approach allowed us to demonstrate the heterogeneity of bottom up constraints in the coastal environment.

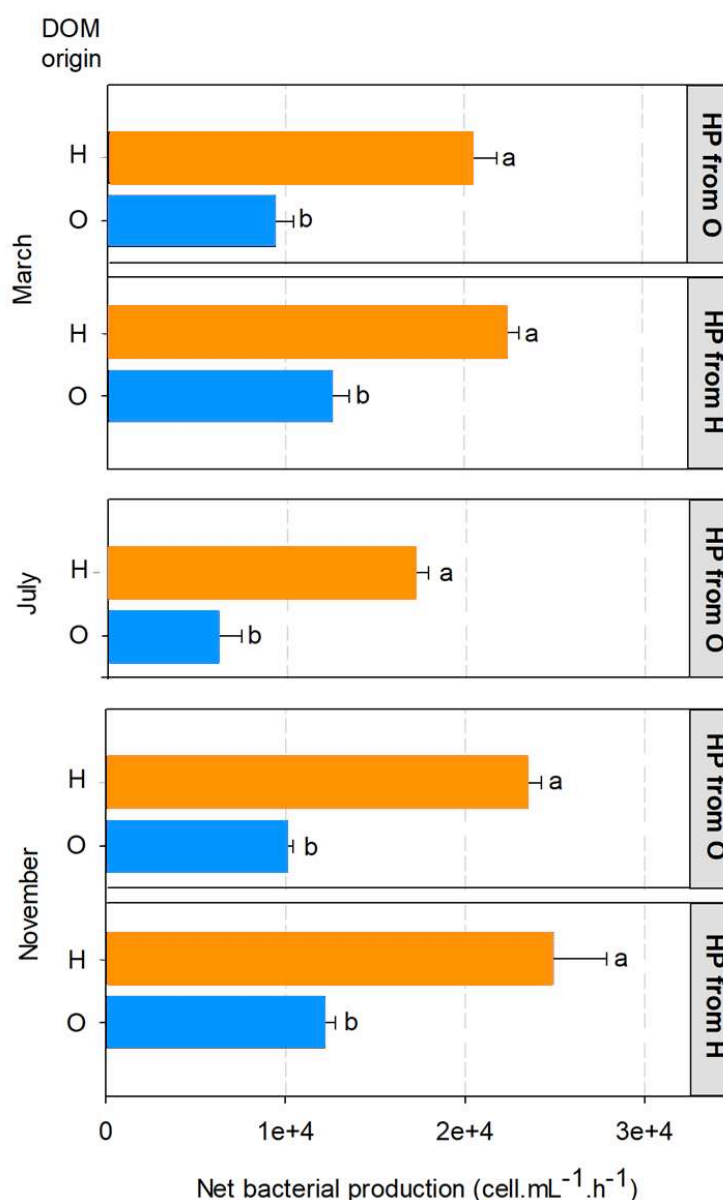


Figure III.4: Net bacterial growth as a function of DOM origin for each campaign. HP origin is specified on the right-hand side, one panel corresponding to one community. H: harbour. O: open coastal area. Orange bars: DOM from H. Blue bars: DOM from O. Error bars represent the standard deviation between experimental triplicates. a, b and c represent the result of Tukey post-hoc multiple comparisons within the same block, the absence of common letters indicating significant difference ($p < 0.05$).

To conclude, the method presented here provides several advantages: it requires few materials, it is easy to set up, results are obtained quickly with only 2 days of incubation using equipment found in most of oceanography laboratories, and thus numerous comparisons could be performed at the same time. It allowed us to evidence important spatial differences in the ability of DOM to sustain heterotrophic growth at the basis of marine planktonic foodwebs. Further systematic deployment along with classical measurements of DOM properties could open interesting perspectives for a causal understanding of the links between DOM fate and microbial loop functioning in marine waters, as well as for a better biogeochemical understanding of human influence on the coastal ocean.

Author Contributions: Conceptualization, C.D., V.L., O.P. and B.M.; methodology, C.D., V.L. and B.M.; formal analysis, C.D.; writing—original draft preparation, C.D.; writing—review and editing, V.L., O.P., B.M.; funding acquisition, V.L. and B.M.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was financially supported by the European Interreg Italy-France Maritime 2014-2020 Project «GEREMIA» (Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali), and by Toulon University, the CARTT of the University Institute of Technology of Toulon and Toulon Provence Méditerranée through project “C-OMICS” (Coupling OMICS approaches for in-depth study of human-induced responses of microbial communities). Clara Dignan received a Ph.D. fellowship from the French Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche and this paper is a part of her Ph.D.

Acknowledgments: The authors are grateful to Bruno Zakardjian, the crew and captain of the R/V Antedon II, the French Navy and the LASEM from Toulon for their contribution to sampling. The authors also thank Benjamin Oursel for his contribution to DOC quantification.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

III.3. Évolution de cette approche expérimentale au cours de la thèse

Ce design expérimental représente une base méthodologique de ce travail de thèse et a été amélioré en permanence pour répondre aux questions scientifiques et aux réflexions autour des différentes études réalisées. Elle a été adaptée au cours de cette thèse pour comparer le potentiel de différents pools de substances dissoutes à stimuler la croissance des procaryotes hétérotrophes, pour étudier l'effet de la disponibilité en diverses substances dissoutes et leur consommation, ou pour évaluer l'influence de la colonne sédimentaire sur les substances dissoutes dans l'eau et leur devenir.

Pour étudier les variations spatio-temporelles de la DOM dans l'étude suivante, il paraissait intéressant d'utiliser la température *in situ* au moment des prélèvements comme température d'incubation afin d'améliorer la représentativité de l'évaluation de l'influence des substances dissoutes sur la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique durant plusieurs saisons. La température a en effet une influence sur la réactivité et l'activité des communautés microbiennes, utiliser la température *in situ* devrait donc correspondre à une meilleure représentativité des réponses microbiennes. De plus, afin d'assurer une bonne détection de la croissance des procaryotes hétérotrophes malgré les variations de température d'incubation, le temps d'incubation sera rallongé à 3 jours. Afin de suivre la réactivité des communautés face à un pool de substances dissoutes, la cinétique de croissance des procaryotes hétérotrophes sera également suivie au cours des expériences avec des sous-échantillonnages réguliers. Une gamme plus importante de paramètres physico-chimiques sera également prise en compte afin de comprendre les phénomènes sous-jacents et ainsi expliquer les différences de croissance observées.

III.4. Variabilité spatio-temporelle de la matière organique dissoute dans des environnements côtiers contrastés et son influence sur la base hétérotrophe du réseau trophique

Les zones côtières sont des écosystèmes à l'interface entre les zones terrestres et océaniques, recevant, de fait, de nombreux apports de substances nutritives, d'origines variées. La majorité de la DOM marine y est d'origine autochtone, principalement issue de la production primaire marine. Elle varie en un lieu donné au cours de l'année, notamment entre les périodes hivernales et estivales, du fait des successions écologiques et de la courantologie. Contrairement aux environnements hauturiers, les zones côtières reçoivent des apports importants de DOM allochtone, résultant de la production biologique terrestre et de sa décomposition, mais également de DOM anthropogénique, de par la pression démographique et les activités humaines qui en découlent. Ces concentrations fortes en un lieu restreint pourraient potentiellement affecter le fonctionnement des écosystèmes côtiers et modifier la dynamique saisonnière naturelle de la DOM, qu'il s'agisse d'apports directs ou via la stimulation de la productivité primaire par des apports de nutriments inorganiques. D'après ces éléments théoriques, la distribution de la DOM dans les environnements côtiers semble particulièrement variable et complexe. En dépit de cette complexité, l'étude de la variabilité spatio-temporelle de la DOM, à petite échelle de temps et d'espace, est primordiale car elle est encore largement inconnue dans cet environnement côtier.

Ainsi, l'étude suivante (article II) présente une étude d'observation des variabilités spatio-temporelles de la distribution et des propriétés de la DOM en zone côtière. La combinaison spatio-temporelle réalisée dans cette étude se veut innovante en comparant la variabilité temporelle à la variabilité spatiale sujette à l'influence combinée des apports terrestres et anthropiques. Le suivi réalisé a également permis d'étendre dans le temps les comparaisons spatiales débutées avec l'étude précédente (article I) les variations spatiales sont constantes et reproductibles. Enfin, cette étude a permis d'évaluer les contributions potentielles de différentes propriétés de la DOM et sources de leur variabilité au soutien de croissance potentielle de la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique.

**III.4.1. Hypervariable DOM properties in coastal NW Mediterranean Sea-Evidences
of strong human influences and potential consequences for the heterotrophic base of
planktonic food webs**

Clara Dignan^{1*}, Véronique Lenoble¹, Nicole Garcia², Benjamin Oursel², Ana-Marija Cindrić³,
Benjamin Misson¹

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

²*Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, Marseille, France*

³*Center for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, P.O. Box 180,
10002 Zagreb, Croatia*

* Corresponding author.

E-mail address: clara.dignan@univ-tln.fr

Article soumis (septembre 2023) dans Estuarine-Coastal and Shelf Science.

III.4.1.1. Abstract

Marine DOM plays a key role in the carbon cycle. Though there is growing interest for its chemical and ecological properties, its variability in the very heterogeneous coastal environment is poorly documented. In this study, we assessed the spatial and temporal variations in marine coastal DOM chemical properties and its potential to support the growth of the heterotrophic basis of the planktonic food-web. For that, we considered two NW Mediterranean coastal sampling stations under contrasted continental and human influences. From January to July 2022, DOC concentration demonstrated a progressive increasing trend in addition to marked spatial differences. DOM composition presented more variations in time than in space. These variations appeared related to a combination of direct freshwater inputs tracked by salinity variations, direct human contaminations tracked by concentrations in Cu and Pb, and phytoplanktonic production. An experimental approach was also used at each sampling date to evaluate DOM ability to support the growth of heterotrophic prokaryotes. Significantly higher growth was observed with DOM from a site under higher continental and human influences. Water temperature exerted a higher control on growth than DOM properties. Correlation analysis with DOM sources suggested the uncoupling of phytoplanktonic production and growth of heterotrophic prokaryotes, which appeared better supported by human contaminations and, to a lesser extent, freshwater inputs. Sediment resuspension in harbors and antifouling paints could represent two important sources of bioavailable resources, favoring fast heterotrophic growth and higher net production, respectively.

Keywords: Dissolved organic matter, coastal ecosystem, Mediterranean Sea, human pressure, heterotrophic prokaryotes.

III.4.1.2. Introduction

Marine DOM is one of the largest carbon pools on the planet (*Hedges et al., 1992; Hansell et al., 2009*) and an important and influential component of global carbon cycle models (*Farrington, 1992*). In the last decades, its spatial and temporal variability across ocean basins and its importance in the biological carbon pump were largely described (*e.g. Hansell et al., 2009, Santinelli 2015*). Its dynamics at various time scales is far from being fully understood. An ecological perspective linking production and consumption processes is emerging, although the role of key environmental drivers is debated (*Shen and Benner, 2020, 2022; Dittmar et al., 2021; Lennartz and Dittmar, 2022*). Through their major contribution to global ocean primary

production (*Gattuso et al., 1998*), highly dynamic marine coastal areas appear as hot spot of DOM production and processing. Along the coast, DOM originates from different sources. In agreement with the high primary production, an important part of coastal marine DOM is autochthonous, mainly resulting from phytoplanktonic activity. It varies along the year, in particular between the winter and summer periods because of ecological successions (*Sommer et al., 2012; Romagnan et al., 2015; Yucel, 2018*). Then, unlike offshore environments, coastal areas receive significant DOM inputs from allochthonous sources. Brought to the coastal environment by the drainage of the watershed, terrestrial DOM resulting from terrestrial biological production and its decomposition can feed coastal waters (*Jonsson et al., 2017; Retelletti Brogi et al., 2021*). Due to increasing demographic pressure, continental and marine human activities threaten marine coastal ecosystems (*Halpern et al., 2008; The MerMex Group et al., 2011*). This situation is particularly relevant around the Mediterranean Sea, given the human population constantly increasing growth and footprint on its shoreline (*UNEP/MAP and Plan Bleu, 2020*). This represents a third source of DOM, non-natural, to the coastal environment: anthropogenic DOM, defined as the mixture of organic substances produced by human activities, brought by rivers and urban runoff, deposited from the atmosphere, or directly discharged into coastal waters (*Vila-Costa et al., 2020*). With this diversity of DOM sources, the high spatial and temporal heterogeneity of coastal environments is now challenging our ability to precisely depict consequences of human influences from natural ones. Increasing scientific observations focused on DOM appears as a first step in the long way necessary to identify and then manage the most influent human activities.

Once produced or brought to the ocean, DOM fate is under the control of various factors among which heterotrophic prokaryotes (HP) are key players. Being the main DOM consumers, able to transform labile compounds into more recalcitrant ones, HP control the microbial carbon pump (*Jiao et al., 2010*) and reinforce the basis of planktonic food webs through heterotrophic assimilation. This heterotrophic base sustains higher trophic levels through the microbial loop (*Azam et al., 1983*). HP contribution to DOM fate is actually a part of a tryptic relationship with DOM properties and environmental conditions, both influencing HP metabolic activity and growth. Indeed, DOM intrinsic properties are known to influence its processing by HP communities (*Amon and Benner, 2001; Shen and Benner, 2020*). Abiotic conditions, such as temperature that can control HP metabolic activity (*Pomeroy and Wiebe, 2001*) or inorganic nutrients availability (*Thingstad et al., 1997*), are also known for their influence on DOM processing by HP. Then, three main biotic characteristics of the marine environment are also contributing. First, HP development is under strong top-down pressure by grazers and viruses

in the marine environment, limiting DOM processing rates (*e.g. Liu et al., 2014; Silva et al., 2019*). Secondly, competition with phytoplankton for inorganic nutrients can reduce the ability of HP to efficiently use DOM (*Thingstad et al., 2005*). Last but not least, DOM reworking by HP communities themselves tends to lower DOM lability and further contributes to limit DOM processing by HP (*Mentges et al., 2019; 2020*). Exposed to a diversity of processes, these numerous controls of DOM fate can result in major changes in biogeochemical functioning. In the coastal environment, terrestrial discharge is for example known for its ability to shift the basis of planktonic food webs from a mainly autotrophic to a mainly heterotrophic metabolism (*Wikner et al., 2012; Jonsson et al., 2017, Barrera-Alba et al., 2019; Navarro et al., 2023*). Numerous human activities on the coasts, especially concentrated in large, urbanized bays, could also influence biogeochemical fluxes through imbalances in DOM properties. Here again, an important observational effort is now needed to understand and model coastal DOM dynamics in this highly variable context for a more sustainable management of human activities.

In this context, this study aimed at documenting spatiotemporal variability in DOM properties in a Mediterranean coastal area, to compare contributions of phytoplanktonic, continental and human influences and to further provide pieces of evidence of ecological consequences. For that, we combined (i) in situ sampling for the characterization of DOM chemical properties and tracers of autochthonous, continental, and anthropogenic sources and (ii) experimental assessment of DOM potential to support HP growth under low top-down pressure. We observed a very large variability in DOM chemical properties with unexpected short-term and spatial changes that override seasonal trends. DOM ability to support the heterotrophic basis of the food web appeared largely controlled by continental and human influences, and strongly modulated by water temperature. This work suggests that human activities and constructions in harbors have the potential to strengthen the heterotrophic basis of the planktonic food web.

III.4.1.3. Material and methods

III.4.1.3.1 Study area and sample collection

The first coastal sampling station was located in Niel Bay on the Giens peninsula (“O”, 43.035325; 6.127527), within Port-Cros National park, located along the French coasts in the North-Western Mediterranean, in an area open to the sea and regularly stirred by the currents. This station is exposed to very limited human pressure and its location in a rocky peninsula strongly reduces any continental influence. To maximise the range of potential variability in

DOM properties, a second sampling station was chosen in Toulon Bay, a site exposed to high levels of anthropogenic activities (1st French naval base, ferry transport, civil harbours, industry, sewage and aquaculture). Human activities in this area have generated multiple chemical contaminations in the water as well as in the sediment (*Tessier et al., 2011; Coclet et al., 2018, Layglon et al., 2020*) and influence biological functioning (*Coclet et al., 2018, 2019, 2020; Paix et al., 2021*). This bay is also under the influence of freshwater discharge, mainly through 2 river outlets (Las and Eygoutier river; *Nicolau et al., 2012; Durrieu et al., 2023*). In this wide bay, the sampling station was more specifically located in the civil harbour of Toulon (“H”, 43.118460; 5.934092), which represents typical civil harbours of the French Mediterranean coast (in the centre of a city, landlocked, with very limited tides, hosting leisure boats as well as artisanal fishing activity). Both sites being located within a restricted geographic area (~ 18 km), they were exposed to similar climatic conditions.

These two stations were sampled every two to three weeks, from January 2022 to July 2022. Standard oceanographic properties including water temperature (°C), salinity and chlorophyll a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were measured using a multiparameter probe (Hydrolab® DS5X). For the different chemical analyses, surface seawater (1 m depth) was sampled at each site with previously washed and conditioned material (see Supplementary Material). One liter of seawater was sampled using a Van-Dorn bottle and transferred in a FEP bottle for chemical characterization. Similarly, 15L of surface seawater were collected at each site and transferred in a 20L LDPE bottle for incubation experiments. To avoid any major changes in the DOM properties and the prokaryotic communities, the samples were brought back in the lab within 2 hours and processed immediately. Subsamples for characterization of dissolved substances, were taken in the 1L FEP bottle as follows: 24 mL were filtered through 0.2 μm polyestersulfone (PES) syringe filters, collected in preconditioned glass tubes, acidified (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) and stored at 4°C waiting for dissolved organic carbon (DOC) concentration measurement. Following the same filtration protocol, 24 mL of filtered water were stored in preconditioned glass tubes at 4°C for further fluorescent DOM (fDOM) evaluation and 50 mL were stored at -20°C in centrifuge tubes (Falcon) for nitrate, nitrite, dissolved organic nitrogen (DON), phosphate and dissolved organic phosphorus (DOP) concentration measurements.

Ten mL of filtered water were also collected in Trace Metal Grade centrifugation tubes (Falcon®), acidified (0.2% v/v HNO₃ sp, analytical grade, Fisher Scientific) and stored at 25°C waiting for copper (Cu) and lead (Pb) concentration measurement by HR-ICP-MS.

III.4.1.3.2 Experimental design

With the aim of setting an experimental approach representative from *in situ* conditions, we incubated natural microbial communities in natural dissolved substances pools. For that purpose, at each sampling date, heterotrophic microbial communities and dissolved substances from each site were isolated by filtration. Seven hundred millilitres of seawater were filtered through a pre-conditioned PES filter (Whatman, 0.2 μm , 47 mm) to recover pools of dissolved substances. In parallel, 100 mL of seawater were filtered through a pre-conditioned GF/F (Whatman, 0.7 μm , 47 mm) to isolate the free heterotrophic prokaryotic (HP) community from each sample. The filtrates were stored at site temperature until the experimental mixtures were processed.

In the lab, the experiments consisted in incubating each pool of dissolved substances to the HP community of the same sampling site. In addition, each dissolved pool was also incubated with the HP community of the other site to evaluate the consistency of DOM potential to support HP growth. The experimental conditions were named “HinH” for the harbour community in its own dissolved substances, “OinO” for the open area community in its own dissolved substances, “HinO” for the harbour community in open area dissolved substances and “OinH” for the open area community in harbour dissolved substances. This experimental approach developed within a previous work (*Dignan et al., submitted a, b*) was hereby adapted to take into account the influence of *in situ* temperature and potentially delayed microbial growth by winter temperature. Thus, incubations lasted 72 h and were performed in the dark at the *in situ* temperature recorded during the sampling (or at the average temperature in case of difference between the two sampling stations). Incubations resulted in 4 triplicated experimental conditions at each sampling date. For each replicate, 54 mL of sterile seawater (< 0.2 μm) containing the dissolved substances was inoculated with 6 mL of seawater containing the HP community (< 0.7 μm) in a preconditioned 60 mL FEP bottle.

Subsamples (1 mL) were taken after 24, 48 and 72 h of incubation, fixed with glutaraldehyde (0.25% final concentration) and stored at -80°C prior to HP enumeration by flow cytometry. Differences in net growth and in particular the maximum heterotrophic prokaryote abundance (mHPA) reached during incubation were used as proxies to compare DOM potential to support HP growth.

III.4.1.3.3 Chemical analysis for field samples

To evaluate the quantitative properties of DOM present at each site, DOC concentrations were determined by high temperature catalytic oxidation using a Shimadzu TOC-VCSH carbon analyser with an accuracy of 0.1 mgC.L^{-1} . DOC analyses were validated by comparison with the DOC consensus reference material (SUPER-05) (*Hansell, 2005; Louis et al., 2009*). Nutrients (nitrate NO_3^- and phosphate PO_4^{3-}) were measured by colorimetric methods using an automated Technicon Autoanalyser III (*Treguer and Le Corre, 1975*) and total matter concentrations (total nitrogen TN and total phosphorus TP) were determined using the wet-oxidation technique (*Raimbault et al., 1999*). Dissolved organic nitrogen (DON) and phosphate (DOP) concentrations were deduced by subtracting nitrate concentration from total nitrogen concentration and phosphate concentration from total phosphorus concentration, respectively. DOM quality was estimated using the composition of DOM fluorescent fraction. Three-dimensional excitation-emission matrices (EEM) of each sub-sample were recorded using a Fluoromax+ spectrofluorimeter (Horiba) using a $1 \times 1 \text{ cm}$ quartz cell. EEMs are used to distinguish fluorescence signals due to various groups of chromophores. The excitation wavelength varied between 220 and 450 nm in 5 nm increments, while the emission was measured between 220 and 600 nm. By using the drEEM toolbox (*Murphy et al., 2013*), the EEMs were corrected from the Milli-Q water EEM measured under the same conditions. EEMs were elaborated to remove and interpolate the Rayleigh and Raman scatter peaks. EEMs were normalized to the Raman signal of water, dividing the fluorescence by the integrated Raman band of Milli-Q water ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 371\text{--}428 \text{ nm}$), measured on the same day of analyses. Thus, fluorescence intensity is expressed in water-equivalent Raman units (R.U.) (*Lawaetz and Stedmon, 2009*). PARAFAC analyses was performed on all EEMs collected during time tracking in MATLAB R2018a (Mathworks, Natick, MA). PARAFAC analyses was performed using two to seven component models with non-negativity constraints. The final four-component model (*Figure S.I. III.1*) was chosen based on residual analyses, split-half analyses, and visual inspection (*Stedmon and Bro, 2008*).

Two trace metals considered as proxies of different human influences in Toulon Bay were considered for this study, copper (Cu) and lead (Pb), as Toulon Bay was demonstrated to present an important metallic contamination (*Tessier et al., 2011*). Cu contamination is linked to the use of antifouling paints (*Lagestrom et al., 2020*). The long residence time of the water within the bay coupled to the absence of tides of the Mediterranean Sea leads to an important contamination of the water, fluctuating with the seasons and the hydrodynamics of the area

(Mazoyer *et al.*, 2020). Therefore, Cu appears strongly enriched in harbours of the bay (Coclet *et al.*, 2018). Hotspots of sediments Pb contamination were highlighted near Toulon, resulting from Second World War boats scuttling (Dang *et al.*, 2015). Through waves, boat traffic or dredging, sediments are remobilised in the water, leading to some metals' desorption, especially Pb (Dang *et al.*, 2020; Layglon *et al.*, 2020). The concentrations of dissolved Cu and Pb were measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS, Agilent 8900 qqq), with a 20-fold dilution for seawater samples to reduce salt-matrix effect. All samples were spiked with an Internal Standard (Indium). A certified reference material (CASS-5, Nearshore seawater reference material for metals, National Research Council Canada) was used as a quality control of ICP-MS measurements. Two separate CASS-5 control samples were measured after every 10–15 samples. Matrix matching calibration (in 20-fold diluted CASS-5 sample) was used for concentration quantification. Determined concentrations of metals in CASS-5 sample were within 15% of the certified reference.

III.4.1.3.4 Heterotrophic prokaryotes abundances (HPA) during incubation

After thawing, samples were stained with SYBR Green (1X final concentration) for 15 minutes in the dark and HP were counted with an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). Fifty microliters were run at a flow rate of 35 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Non-fluorescent polystyrene microspheres (Flow Cytometry Size Calibration Kit, Thermo Fisher Scientific) were used as a size standard. Particles considered as HP were smaller than 2.0 μm , exhibited low complexity (low SSC), emitted green fluorescence and no red fluorescence (Grégori *et al.*, 2001). Data were acquired using BD Accuri CFlow Plus software and HPA expressed as cells per milliliter ($\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$). Maximal HP abundances (mHPA), always recorded after 72h, were used for interpretations.

III.4.1.3.5 Statistical analyses

All statistical analyses were performed with RStudio 2022.7.0.548 software (RStudio Team, 2022) under R 4.2.0 environment. The variability of DOM properties according to sampling stations was represented through PCA with *stats* and *ggplot2* packages. Significant contribution of the represented variables was verified with the *envfit* function of the *vegan* package.

After verifying the normal distribution and homoscedasticity of the variances with Shapiro and Levene tests, respectively, analyses of variance (ANOVA) were used to compare the mHPA obtained under each experimental condition at every sampling date using *rstatix* package. If the

ANOVA detected a significant difference (p -value $< 0,05$), a pairwise T test, with the Bonferroni method for the p -value correction, was then used to distinguish which samples were significantly different from the others (p -value $< 0,05$). Wilcoxon tests were used to compare the average values of environmental variables between the two sites over the entire monitoring period.

To investigate the relationships between DOM properties and potential sources of variation, Spearman rank pairwise correlation tests were performed using the “vegan” package in R. Corresponding heatmaps were built using ggplot2. For specific correlation analysis between environmental variables and HP growth, we considered growth kinetics in addition to mHPA. For that, daily net growth was calculated by subtracting HPA recorded at the beginning of the 24h time frame to HPA recorded at the end. Then, Spearman rank pairwise correlation tests were performed and represented through heatmaps, as described above.

III.4.1.4. Results and discussion

III.4.1.4.1 Spatial and temporal variability in DOM chemical properties and potential sources

Overall variability in DOM properties (DOC, DON, DOP and fluorescent components) at the two studied stations throughout the temporal sequence were visualized by a Principal Component Analysis (*Figure III.5*). The two-dimension representation covered $\sim 70\%$ of the observed variations. Such representation allows to highlight an important temporal variability, which is accentuated at station H, the temporal sequence spreading far more than those from station O. There is no seasonal trend, whatever the considered station, pointing to occasional variations. Such variability appeared to be mainly driven by DOC, DON and three fluorescent components.

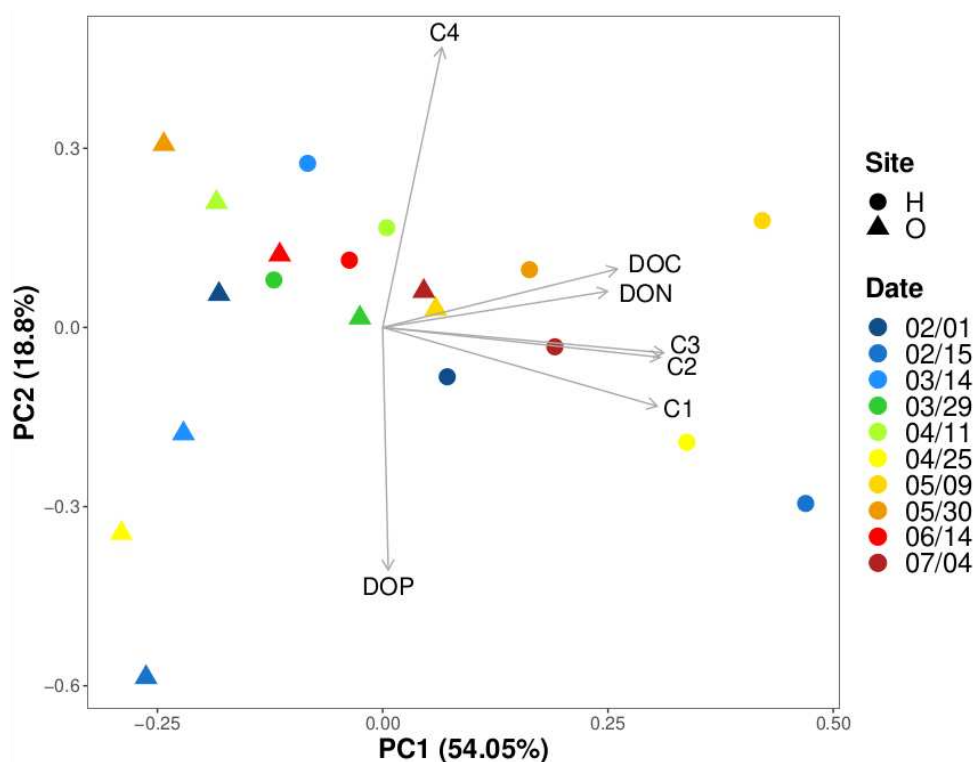


Figure III.5: Principal component analysis of the variation of DOM properties through time and space. H: harbour; O: open area. Indicated sampling dates correspond to 2022.

During the monitoring, DOC showed significant variations at both stations (from ~ 60 to ~ 85 μM at station O, and from ~ 70 to 105 μM at station H; *Figure S.I. III.11*). Such values are in the range of the reported values for this long-time studied area (*Dang et al., 2018; Coclet et al., 2019; Layglon et al., 2022; Durrieu et al., 2023*). The average DOC concentrations increased throughout the temporal sequence. While average DOC concentration appeared significantly higher at H ($p\text{-value} < 0.05$), temporal variations within a given station were of similar extent to inter-stations variations (~ 15 μM). DON and DOP concentrations varied between ~ 4 to 15 μM and ~ 0.1 and 0.3 μM , respectively. These ranges are in line with previous observations in another NW Mediterranean coastal site located close to an urbanized bay (*Céa et al., 2015*). No clear temporal trend could be observed (*Figure S.I. III.11*), and the temporal punctual variations within one station were more important than inter-stations variations. Differences in average concentrations in DON and DOP between H and O were not statistically significant ($p\text{-value} > 0.05$).

The PARAFAC analysis performed on the EEMs allowed to identify four fluorescent components (*Figure S.I. III.10*). From the literature and the OpenFluor database, component 1 corresponded to marine humic-like organic matter ($\text{C1}_{\text{MarHum-like}}$), component 2 to tryptophan-like ($\text{C2}_{\text{Trp-like}}$), component 3 to terrestrial fulvic-like ($\text{C3}_{\text{TerFul-like}}$) and component 4 to tyrosine-

like (C4_{Tyr-like}). At station O (*Figure S.I. III.11*), the fluorescence intensity of the different compounds showed very limited variation. At station H, C1_{MarHum-like}, C2_{Trp-like} and C3_{TerFul-like} were significantly enriched when compared to station O ($p < 0.01$). Components C2_{Trp-like} and C3_{TerFul-like} were highly variable (*Figure S.I. III.11*), which is in line with the PCA results.

These numerous spatial and temporal variations in DOM chemical properties could reflect different processes and sources. First, significantly higher concentrations in chlorophyll a were observed at H (p -value < 0.001), which agrees with previous observation of phytoplanktonic diversity suggesting higher production in the most enclosed parts of Toulon Bay (*Coclet et al., 2018; Delpy et al., 2018*). Then, other sources could explain these higher concentrations, like the input of freshwater or the concomitant input of organic matter and contaminants related to human activities. Salinity was significantly lower and trace metallic contamination was significantly higher at H (p -value < 0.05). Most of salinity variations could be related to the difference in land influence between the two sampling stations, illustrated by the presence of two rivers (Las and Eygoutier) in Toulon Bay. They are characterized by a usually small discharge, except during the typical Mediterranean violent but short storms (*Nicolau et al., 2012; Durrieu et al., 2023*). Station H being located within Toulon harbor in the North-Western part of Toulon Bay and station O appearing far more remoteness, spatial differences in trace metallic contamination are in good agreement with previous observations in the area (*Coclet et al., 2018, 2019, Layglon et al., 2020*). Concerning temporal variability, salinity, Chl a and trace metals did not fluctuate much at station O when strong variations were recorded at station H (*Figure S.I. III.12*). As previously explained, station O is prone to very limited continental and human influences, which explains these small fluctuations. On the other hand, station H is exposed to both higher continental and human influences, as well as located in an area showing high variability in hydrodynamics (*Dufresne et al., 2014; Mazoyer et al., 2020*).

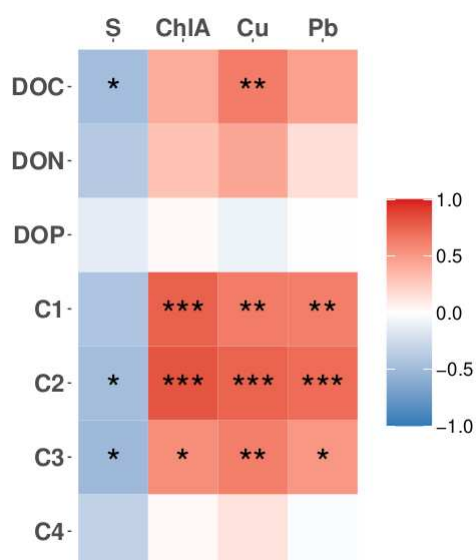


Figure III.6: Correlation analysis between variations in DOM chemical properties and the considered sources. C1 to C4 are representing the fluorescent components identified with PARAFAC: marine humic-like, tryptophan-like, terrestrial fulvic-like and tyrosine-like, respectively. The color scale corresponds to Spearman's correlation coefficients. 1, 2 and 3 stars represent a p -value < 0.05 , < 0.01 and < 0.001 , respectively.

As all these processes and sources could influence DOM chemical properties, a correlation analysis was performed (Figure III.6). Looking at DOM quantitative properties, DON and DOP did not present any significant correlation with any of the studied source tracers. Salinity was negatively correlated with DOC, suggesting DOC-rich freshwater inputs. Terrestrial discharges through freshwater often represent an important source of DOC to the coastal sea, as observed elsewhere in the oligotrophic Mediterranean Sea (e.g. Navarro et al., 2023). Then the positive relationship between Cu and DOC let us hypothesize that they have a common source: the antifouling paints. As a matter of fact, the new generation of antifouling paints are designed to be self-polishing (Watermann & Eklund, 2019), which means that they are progressively degrading through hydrolysis, releasing a whole set of compounds in the water, including some organic compounds from the polymeric matrix (Yebera et al., 2005). Surprisingly, DOC concentration was not correlated to chlorophyll concentration, an observation that sets the difference with other Mediterranean contexts (Avril, 2002; Santinelli et al., 2015, 2020).

The composition of DOM, expressed through fluorescent components C1_{MarHum-like} and C2_{Trp-like}, was highly linked with chlorophyll (Figure III.6). This strongly suggest the influence of fresh phytoplanktonic production of DOM and heterotrophic reworking on its chemical quality. Indeed, protein-like fluorescent components (such as C2_{Trp-like} in this study) is known to be

produced and exuded during marine phytoplankton exponential growth (*Bachi et al., 2023*). Moreover, marine humic-like fluorescence ($C1_{\text{MarHum-like}}$) is often associated with autochthonous fluorescent DOM and its presence has historically been linked to elevated biological activity in the water column (*Nieto-Cid et al., 2005; Stedmon and Markager, 2005; Romera-Castillo et al., 2010*). Then, negative correlations between fluorescence intensities and salinity suggest an indirect contribution of freshwater inputs that could stimulate phytoplanktonic production. The correlation between salinity and fluorescent component $C3_{\text{TerFul-like}}$ support the hypothesis of influent continental inputs of DOM. Lastly, DOM composition appeared related to the studied metals. These correlations being positive, any toxic influence can be neglected but such covariations support common sources. This strongly support the hypothesis of a strong impact of antifouling paints and sediment remobilization on DOM chemical properties.

In the studied area, DOM is thus presenting a huge variability, partly linked to the temporal sequence. It should be underlined that the temporal qualitative variations in a considered station largely overpass the inter-station variations. This statement is exacerbated at station H, a more land-connected area exposed to numerous anthropogenic activities. DOM quantity and properties are deeply linked with these covarying potential sources of direct and indirect influences.

III.4.1.4.2 Stimulation potential of the heterotrophic basis of the planktonic food web

During incubation experiments, HPA increased in all conditions. Several growth phases were observable: an exponential growth phase before growth slowed down when the community reached the carrying capacity of the system (*Figure S.I. III.13*). However, from January 18th to March 29th no plateau was observed, suggesting that the carrying capacity might not have been reached after three days of incubation, the communities being still in the exponential growth phase. In comparison of the potential dissolved substances to sustain heterotrophic growth, the maximum Heterotrophic Prokaryotic Abundance (mHPA) reached in each incubation was used. It was systematically reached after 72h of incubation.

The use of dissolved substances from H resulted in a high temporal variability ($H_{\text{inH}}: 1.38 \pm 0.88 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$, $O_{\text{inH}}: 1.09 \pm 0.90 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$) and promoted the highest mHPA (*Figure III.7*). With dissolved substances from O, variations were smaller though still important ($H_{\text{inO}}: 5.49 \pm 0.25 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$, $O_{\text{inO}}: 3.14 \pm 0.22 \times 10^5 \text{ cell.mL}^{-1}$). No clear

temporal trend could be depicted, and several punctual important variations were observed. Average mHPA appeared significantly lower with dissolved substances from O than with those from H (p -value $< 10^{-4}$). This observation agrees with previous observations in the same geographic area (*Dignan et al., submitted a, b*). Differences in growth stimulation between the two pools of dissolved substances were well supported whatever HP origin from April to July. However, the influence of HP origin was predominant from January to March. While it has been proposed in the literature that a given DOM pool could be more available to some HP communities than others (*e.g. Carlson et al., 2004*), longer incubations allowing to reach the carrying capacities would have been necessary to validate this conclusion. Nevertheless, the observed delayed growth at that period suggests at least a higher reactivity of HP from H. More work is now needed to explore this trend associated to winter and rather cold waters.

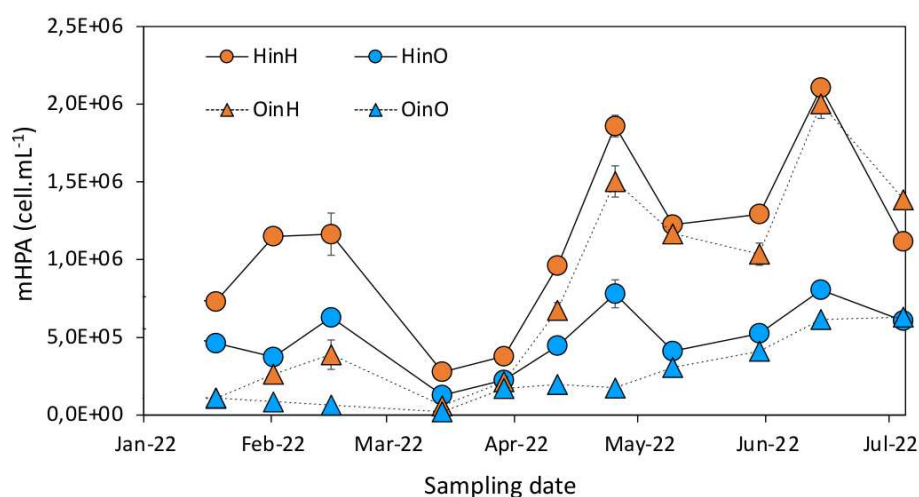


Figure III.7: Maximum heterotrophic prokaryotes abundance (mHPA) as a function of DOM origin for each campaign. HP origin is specified by point shapes, circles: Harbour (H); triangles: Open area (O). DOM origin is specified by point colours, orange: Harbour (H); blue: Open area (O). Error bars represent the standard deviation between experimental triplicates.

Utilization of marine DOM by HP for biomass and energy production is known to be determined by DOM quantitative and qualitative properties (*Del Giorgio and Cole, 1998; Amon and Benner, 2001; Shen and Benner, 2020*), but inorganic nutrients supply can also play a key role when DOM composition does not meet HP stoichiometric requirements (*Thingstad et al., 1997*). Moreover, through its influence on microbial metabolism, water temperature is known to regulate HP growth rates (*Pomeroy and Wiebe, 2001*), especially when nutrient supplies are not limiting (*Thingstad and Asknes, 2019*). To better evidence the abiotic variability that could

explain the observed variations in HP growth according to time and space, we also considered water temperature, as well as nitrate and phosphate concentrations in addition to environmental variables presented above (*Figure S.I. III.14*). Seawater temperature gradually increased over the studied period, rising from ~ 13 °C in January to ~ 25 °C in July. It presented similar temporal variations at both stations, H being slightly colder in winter and warmer in summer. Phosphate concentrations measured at H (0.06 ± 0.11 μM) were similar to previous measurements in another NW Mediterranean site (*Céa et al., 2015*). They were significantly lower at O (p-value < 0.01) and very low compared to previous observations (0.01 ± 0.01 μM ; *Céa et al., 2015*). While it appeared highly stable at O, important punctual increases were observed at H, reaching concentrations up to 20 times higher than at O (*Figure S.I. III.14*). During the studied period, nitrate concentrations remained low and stable at O (0.29 ± 0.28 μM), while they were significantly higher (p-value $< 10^{-4}$), hugely variable (6.73 ± 8.10 μM , *Figure S.I. III.14*) and elevated at H when compared to another French Mediterranean coastal station under the influence of an urbanized bay (*Céa et al., 2015*).

Correlation analyses between HP growth metrics and environmental variables in the whole dataset highlighted numerous highly significant correlations (*Figure III.8*). The correlation with water temperature is in good agreement with its well-known effect on microbial metabolism and growth (*Pomeroy and Wiebe, 2001*). Considering DOM properties and inorganic N and P supplies, DOC concentration appeared as the most influent factor for growth kinetics and total net growth (*Figure III.8*), growth being faster and more important when DOC concentration was higher. This observation is supporting the debated role of DOC concentration on microbial behaviours (e.g. *Shen and Benner, 2020, 2022; Lennartz and Dittmar, 2022*). Then, qualitative properties of DOM also appeared influent, especially stimulating mHPA, when C1_{MarHum-like}, C2_{Trp-like} and C3_{TerFul-like} fluorescence and DON concentration were higher (*Figure III.8*). The influence of nitrate concentration appeared similar to these DOM properties. These observations are in line with the influence of DOM qualitative properties on HP growth (*Del Giorgio and Cole, 1998; Amon and Benner, 2001; Shen and Benner, 2020*). Phosphorus content of DOM did not present any correlation with HP growth in our study. Similarly, inorganic phosphorus presented very weak correlations with growth (*Figure III.8*). Although the weak apparent influence of phosphorus could appear quite surprising when considering the well-established phosphorus limitation of HP growth in the Mediterranean Sea (e.g. *Van Wambeke et al., 2002; Céa et al., 2015*), this observation suggests that the proximity of the shoreline in both studied sites ensured sufficient phosphorus loading. Finally, correlations between HP growth metrics and nitrate, DON and FDOM were weaker and no longer significant when

considering a single sampling station (data not shown). Thus, these substances would more be responsible of spatial variations in the potential of dissolved pools to sustain the heterotrophic growth at the basis of the planktonic food web than the temporal one. On the other hand, temperature and DOC concentration still presented significant and strong correlation, whatever the station, suggesting their combined influence on temporal variabilities in HP growth sustainment.

Correlations with tracers of potential sources of dissolved sources highlighted interesting patterns. Indeed, chlorophyll a appeared very poorly correlated to HP growth metrics whereas salinity was very significantly and negatively correlated to early and total net growth (*Figure III.8*). This observation suggest that HP growth was more stimulated by freshwater inputs than by variations in phytoplanktonic production, even though salinity variations were small. Similarly, Cu and Pb showed far stronger and more significant correlations with early and total net growth than chlorophyll a (*Figure III.8*). Such correlations being positive, they demonstrate the absence of toxicity of these metals in our study and suggest that the heterotrophic base of the planktonic food web in the considered marine area could largely be sustained by human activities. While it is generally considered that phytoplanktonic production is the main source of organic substrates for HP growth in oligotrophic marine environments, shifts in the autotrophic/heterotrophic balance have been observed in environments under strong allochthonous inputs such as estuaries (*Barrera-Alba et al., 2009; Wikner & Andersson, 2012; Jonsson et al., 2017*). Our results strongly support the idea of such shifts in the studied area, even in the absence of major riverine inputs, and points out the strong influence of human activities on biogeochemical functioning at the basis of the planktonic food web. Such impact could be linked to direct inputs of dissolved substances but also to increased water residence time because of human constructions, and subsequent accumulation favouring eutrophication. Indeed, in the same area, an important increase of water residence time has been demonstrated at rather large scale under the influence of the main seawall of Toulon Bay (*Dufresne et al., 2014*), an influence that is probably even more important in enclosed docks such as Toulon civil harbor.

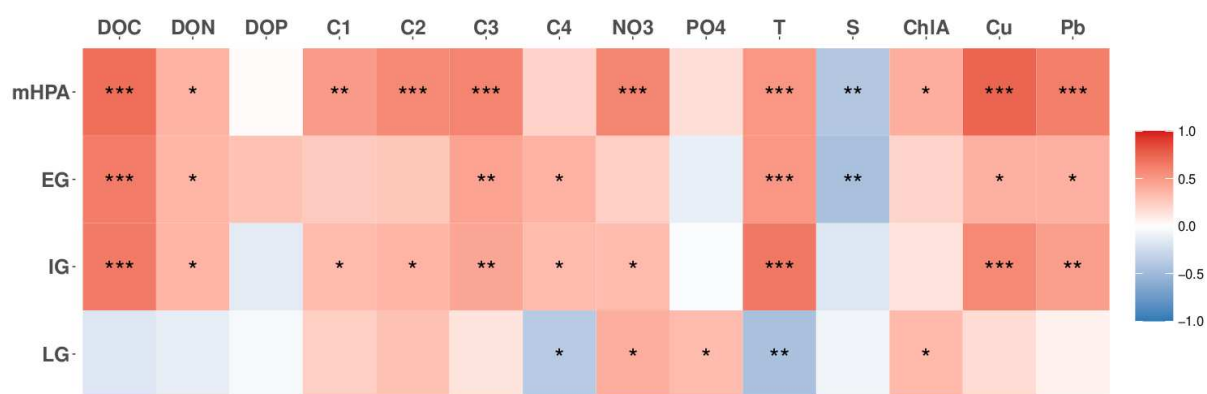


Figure III.8: Correlation analysis between HP growth, DOM properties, other constraining factors and the considered tracers of potential sources of dissolved resources. mHPA: maximal heterotrophic prokaryotes abundance, EG: early growth (between 0 and 24h), IG: intermediate growth (between 24 and 48h), LG: late growth (between 48 and 72h). The color scale corresponds to Spearman correlation coefficients. 1, 2 and 3 stars represent a p-value < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively.

To get more insights into human influences, another correlation analysis was performed focusing on the results obtained with water from H, the harbour being exposed to multiple human influences (Figure III.9). This analysis confirmed the absence of significant correlation with chlorophyll a. Moreover, it did not show any correlation with salinity, suggesting that the above-mentioned significant correlations were mainly linked to differences among the chosen sampling stations. Interestingly, Cu and Pb demonstrated different significant and positive correlations with growth metrics, higher concentrations in Cu being associated to higher total net growth and higher Pb concentrations being associated to higher early growth. In Toulon Bay, the highest concentrations in dissolved Cu concentrations were observed in civil harbours (Coclet *et al.*, 2018, 2019), suggesting antifouling paints as a major source for this contamination. Considering that, our study tends to demonstrate that the concentration of boats in civil harbours could additionally be responsible for organic contamination of the water with consequences for biological functioning. Concerning Pb, it was well demonstrated in the area by field work as well as lab experiments that sediment resuspension was a major source of dissolved Pb (Dang *et al.*, 2015, 2020; Layglon *et al.*, 2020). Our work then suggest that such resuspension influences dissolved nutritive substances in the water column and affect biogeochemical functioning at the basis of the planktonic food web.



Figure III.9: Correlation analysis between HP growth with water from Toulon harbour and the considered tracers of potential sources of dissolved resources. mHPA: maximal heterotrophic prokaryotes abundance, EG: early growth (between 0 and 24h), IG: intermediate growth (between 24 and 48h), LG: late growth (between 48 and 72h). The color scale corresponds to Spearman correlation coefficients. 1, 2 and 3 stars represent a p-value < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively.

III.4.1.5. Conclusion

This study evidences a strong variability of DOM chemical properties in a coastal NW Mediterranean area. Important temporal changes were observed, with a seasonal pattern for DOC concentration and punctual changes in DOM qualitative properties. Such changes were amplified in a nutrient-rich harbour when compared to an oligotrophic open coastal site. Consequently, DOM ability to support heterotrophic growth at the basis of the planktonic food web was far higher when originating from the harbour, and more linked to quantitative DOM properties than to qualitative ones under our experimental conditions. Continental and anthropogenic sources appeared to be the main support of heterotrophic growth, which was additionally regulated by water temperature.

Acknowledgements

This project was financially supported by Toulon University and the CARTT of the University Institute of Technology of Toulon and by the European Interreg Italy-France Maritime 2014-2020 Project «GEREMIA» (Gestione dei reflui per il miglioramento delle acque portuali) and by the Regional Council of Provence Alpes Côte d’Azur (France). Clara Dignan received a Ph.D. fellowship from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche and this paper is a part of her Ph.D.

III.4.1.6. Supplementary materials

The water samples were taken with a horizontal van Dorn type water sampler (Wilco, model Beta) previously cleaned with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) and thoroughly rinsed with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) in the laboratory. In the field, the sampler was rinsed with seawater from the site to be sampled before sampling.

Fifteen litres of seawater were stored in a twenty-litre bottle and one litre was stored in a fluorinated ethylene propylene (FEP) bottle. These containers were, in the laboratory, previously rinsed three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), sterilized with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) for 24 hours under stirring, rinsed again three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) then filled with acid (0.1% v/v HCl, Trace Metal Grade, Fluka). On field, the FEP containers and bottles were rinsed three times with seawater from the site to be sampled.

All the FEP bottles used for incubation experiments followed the same conditioning protocol described above.

Dissolved substances and heterotrophic communities were isolated by filtration during the experiment. In order to avoid possible contamination of the carbon filtrates, the 0.2 μ m polyestersulfone filters (Whatman, 47 mm) were previously washed with 100 mL of acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific), rinsed with 1L of Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), then packaged with 150 mL of the sample to be filtered. The GF/F glass fiber filters were previously calcined (450°C, 6h), rinsed with 1L of Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) then conditioned with 150 mL of the sample to be filtered.

The 24 mL glass tubes used for the DOC concentration and DOM fluorescence intensity analysis were previously rinsed three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), sterilized with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) for 24 hours, rinsed again three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) then calcined (450°C, 6 hours). At the time of sampling, they were rinsed three times with the filtered sample before being filled.

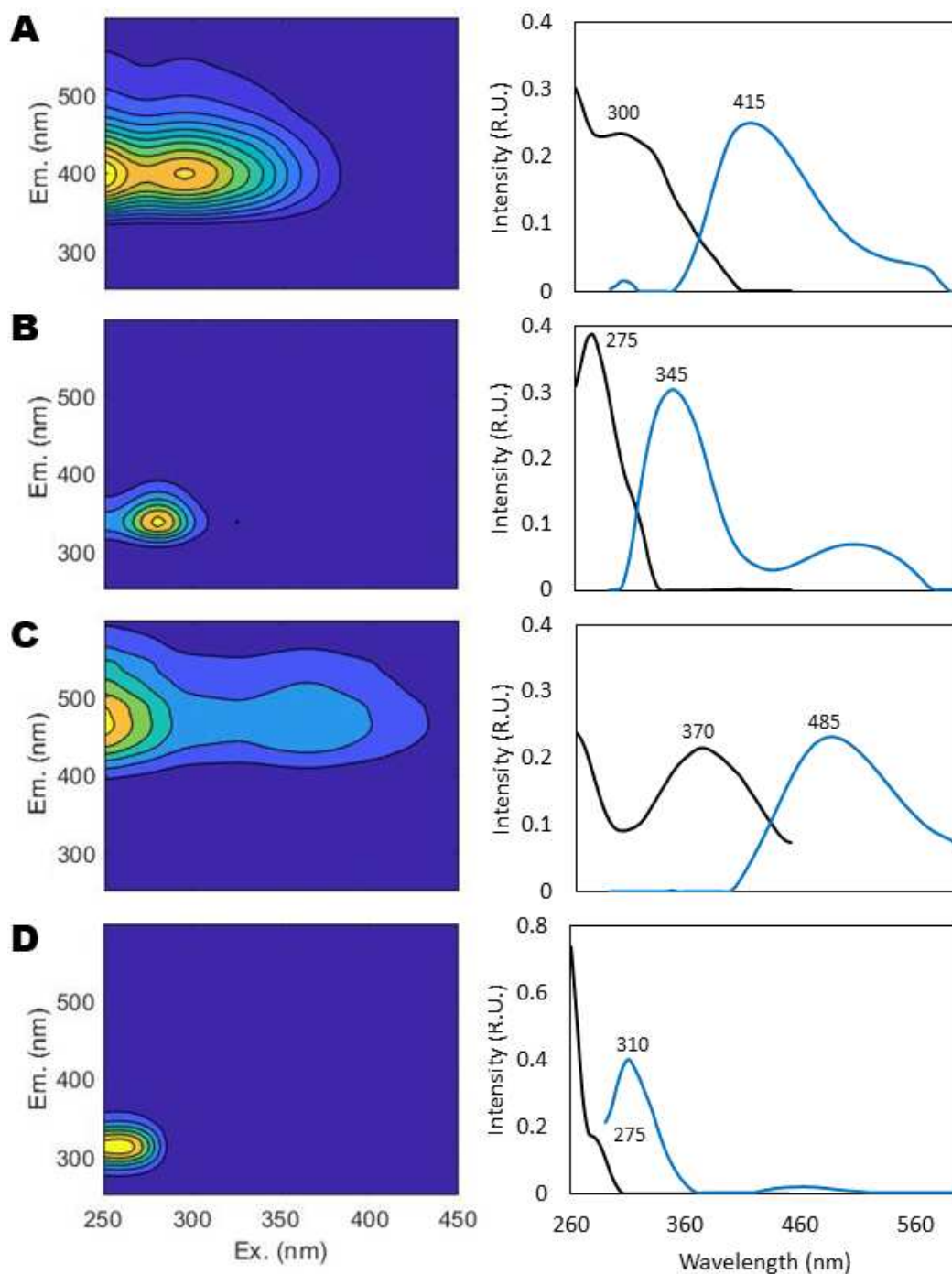


Figure S.I. III.10 : Fluorescence signatures of the four PARAFAC components identified: (A) C1 marine humic-like, (B) C2 tryptophan-like, (C) C3 terrestrial fulvic-like, (D) C4 Tyrosine-like. Contour plots of components C1 - C4 are ordered by decreasing percent explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation on the x-axis, and shading representing the relative intensity of emission. Corresponding line plots to the right of each contour plot represent the excitation (black curve) and emission (blue curve) spectra of each component. The x-axis in the line plots is excitation or emission wavelength, with relative intensity on the y-axis.

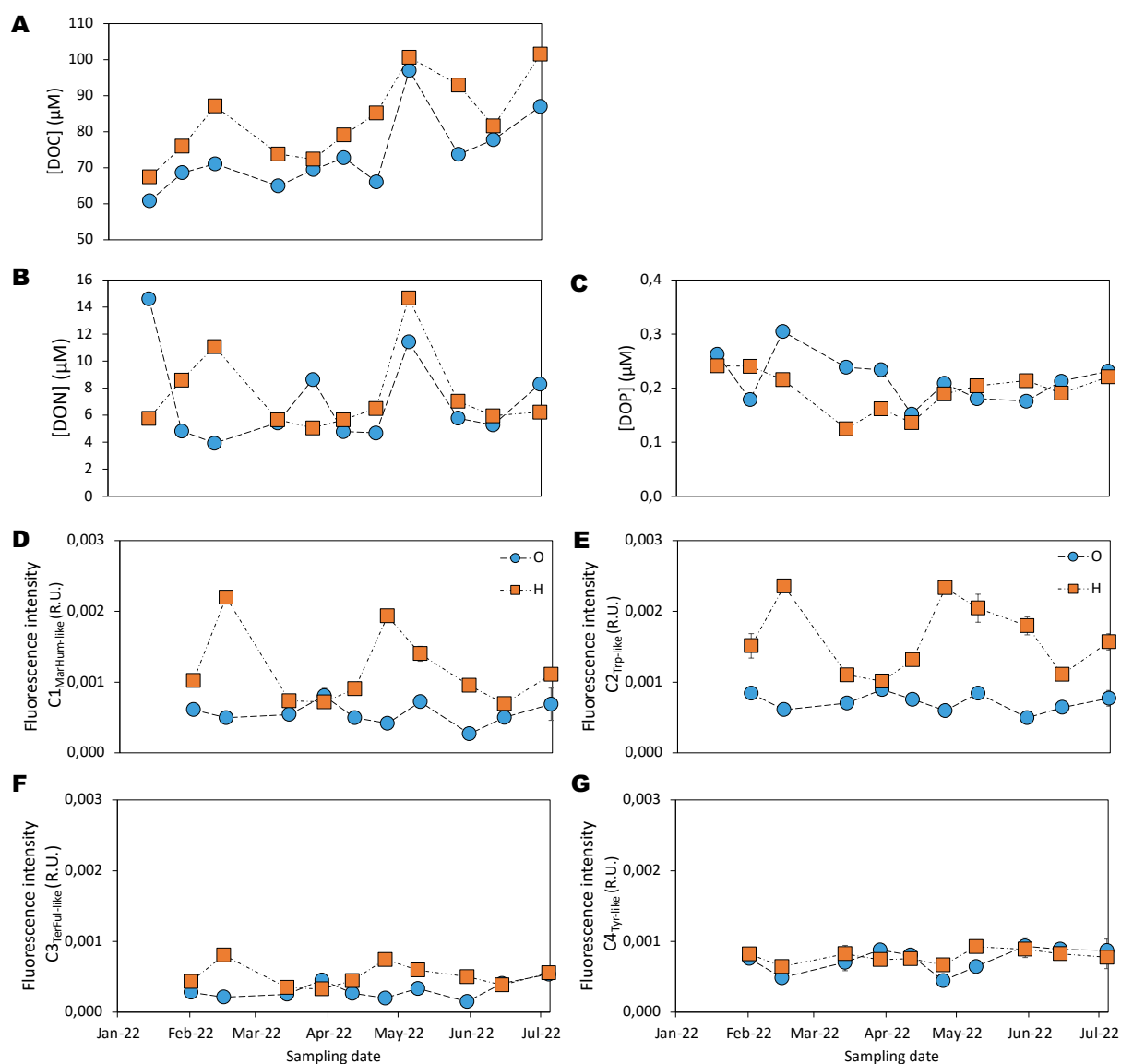


Figure S.I. III.11: Comparison of the temporal dynamics of abiotic parameters between harbour area (□) and open area (○). (A) Dissolved Organic Carbon (DOC), (B) Dissolved Organic Nitrogen (DON), (C) Dissolved Organic Phosphorus (DOP), and Fluorescence intensity of (D) $C1_{\text{MarHum-like}}$, (E) $C2_{\text{Trp-like}}$, (F) $C3_{\text{TerFul-like}}$ and (G) $C4_{\text{Tyr-like}}$ identified by PARAFAC analysis. Error bars denote standard error of triplicate analyses.

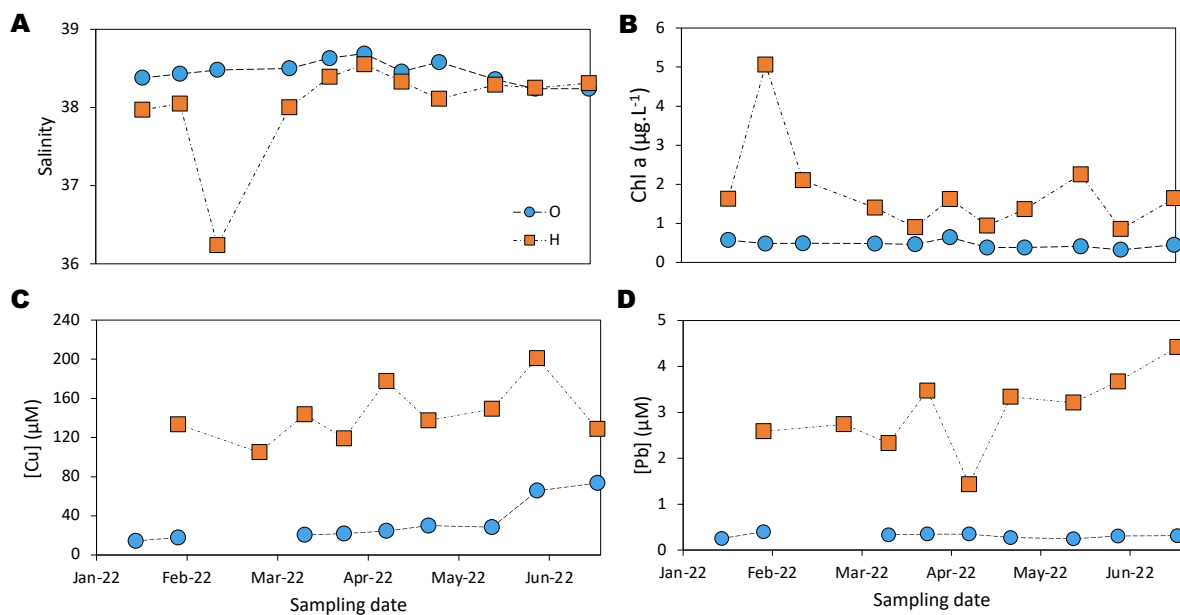


Figure S.I. III.12: Comparison of the temporal dynamics of abiotic parameters between harbour area (\square) and open area (\circ). (A) Salinity, (B) Chlorophyll a, (C) Copper (Cu) concentration, (D) Lead (Pb) concentration.

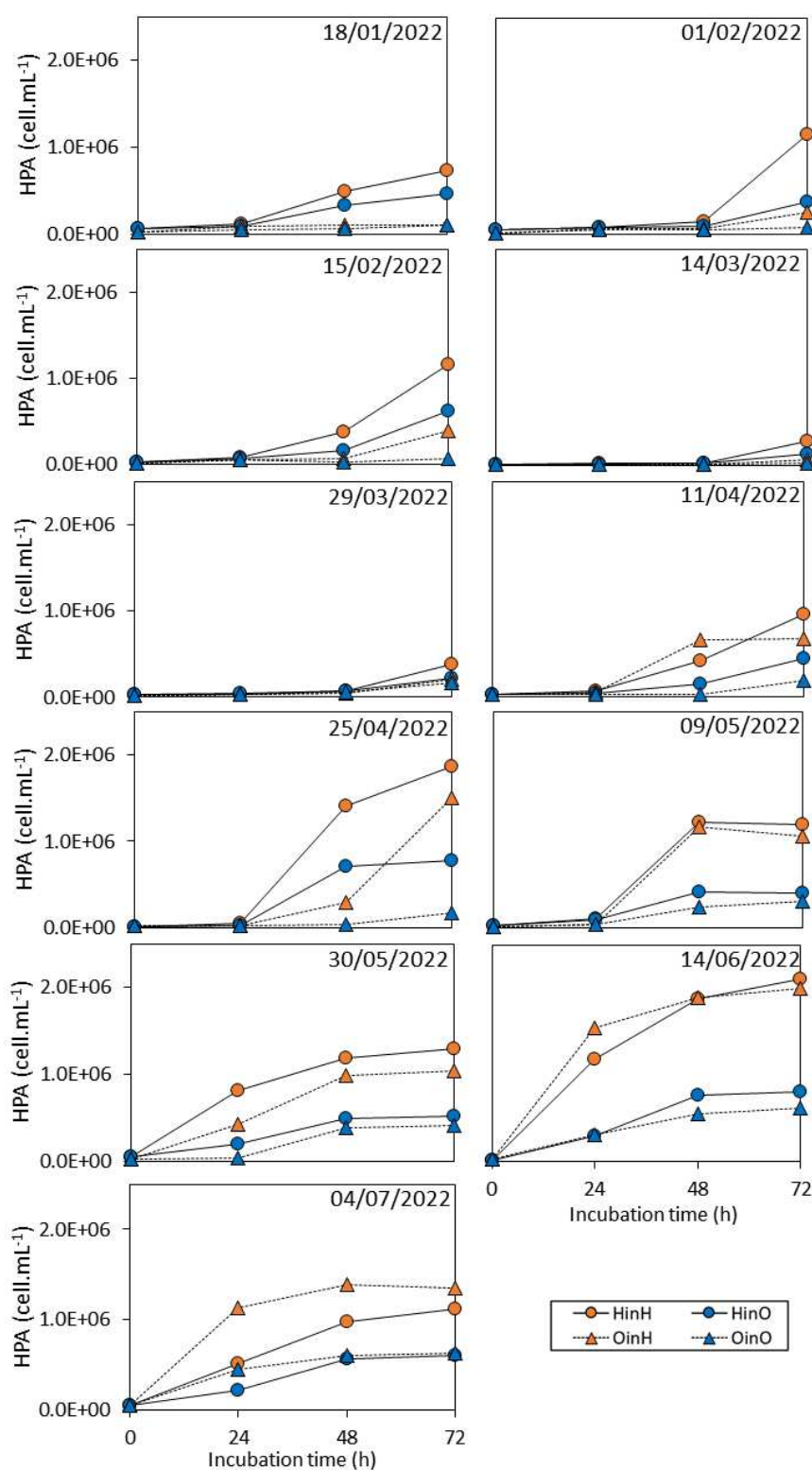


Figure S.I. III.13: Heterotrophic prokaryote abundances (HPA) as a function of DOM and community origin for each campaign. HP origin is specified by point shapes. Circles: Harbour HP. Triangles: Open area HP. DOM origin is specified by point colours. Orange: Harbour DOM. Blue: Open area DOM. Error bars represent the standard deviation between experimental triplicates.

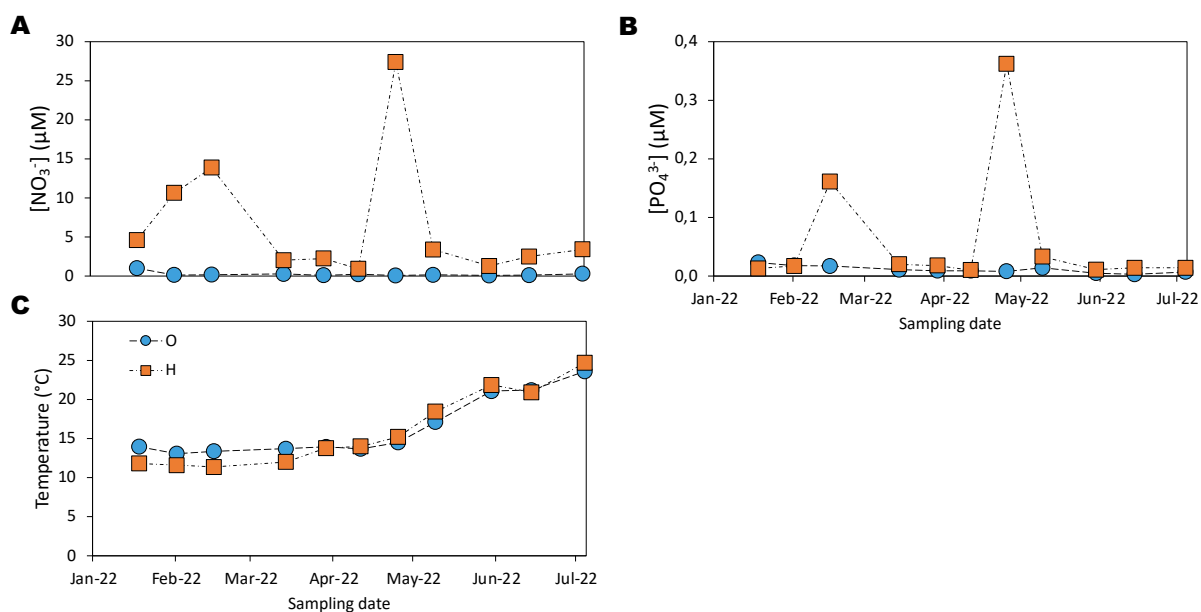


Figure S.I. III.14: Comparison of the temporal dynamics of abiotic parameters between harbour area (□) and open area (○). (A) Nitrate (NO_3^-), (B) Phosphate (PO_4^{3-}), (C) Temperature.

III.5. Conclusion du chapitre

Les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence une grande variabilité spatio-temporelle des substances dissoutes dans le temps et l'espace, à petite échelle géographique. Cette étude n'a mis en évidence que peu de tendance saisonnière claire mais plutôt d'importantes variations temporelles ponctuelles pouvant être communes aux deux sites ou spécifiques à un site. Ces variations ponctuelles enregistrées lors du suivi sont plus fréquentes et ont généralement une plus grande amplitude sur le site portuaire, plus impacté par les pressions anthropiques et sous plus grande influence continentale. Ces variations semblent liées à une combinaison d'apports directs d'eau douce, de contaminations humaines et de production phytoplanctonique. Ces apports ont altéré la composition de la DOM et augmenter la concentration en nutriments.

L'approche expérimentale réalisée dans cette étude a permis d'évaluer la capacité de la DOM à supporter la croissance des procaryotes hétérotrophes. Dans les conditions expérimentales, les plus fortes croissances ont été observées lorsque des procaryotes hétérotrophes étaient exposés à des substances dissoutes issues de la zone portuaire, sous forte influence continentale et anthropique. La répétabilité de cette observation avec deux communautés microbiennes, confirme les résultats de l'étude précédente et fait des propriétés chimiques des substances dissoutes, notamment la composition de la DOM et la quantité d'azote et de phosphore, le principal moteur de la croissance des procaryotes hétérotrophes. Toutefois, la température de l'eau semble exercer un contrôle plus élevé sur la croissance que les propriétés du DOM. En effet, la réactivité des communautés microbiennes était dépendante de la température de l'eau. Lorsque la température de l'eau était supérieure à 15°C, les communautés présentaient un taux de croissance maximal dès les premières 24 heures. A l'inverse, lorsque la température de l'eau n'excédait pas 15°C, les communautés présentaient un taux de croissance maximal entre 48h et 72h d'incubation, leur densité maximale n'étant probablement pas toujours atteinte après 72h. Ces observations suggèrent que dans les zones côtières, l'altération potentielle de la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique sous influence continentale et humaine confondues est plus rapide lorsque l'eau est chaude, stimulant ainsi la reminéralisation de la DOM ou son transfert vers les niveaux trophiques supérieurs. A l'inverse, l'eau plus froide est plus propice à l'export et la dilution de la DOM. Dans le contexte du changement climatique actuel entraînant le réchauffement des eaux et de nombreuses vagues de chaleur, ces hypothèses amènent à des considérations sur le devenir de la DOM en zone côtière

CHAPITRE IV.

HIÉRARCHISER LES FACTEURS RESPONSABLES DES VARIATIONS DE LABILITÉ DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE

IV.1. Avant-propos

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence une grande hétérogénéité spatio-temporelle de la DOM à petite échelle. Nous avons montré que les propriétés des substances dissoutes étaient modifiées dans une zone portuaire et que des phénomènes ponctuels peuvent accentuer l'amplitude de ces modifications. Le soutien de la croissance des procaryotes hétérotrophes est en conséquence affecté, la température de l'eau modulant par ailleurs la réactivité de ces microorganismes. A l'issue de ces observations, il était nécessaire d'améliorer la compréhension des facteurs contrôlant la prise en charge de la DOM par les procaryotes hétérotrophes et son devenir dans des conditions relativement simplifiées.

Ce chapitre présente une étude sous forme d'article scientifique (article III, en cours de finalisation avant soumission dans *Limnology & Oceanography*) qui consiste à caractériser et hiérarchiser les facteurs contrôlant la croissance des procaryotes hétérotrophes et le devenir de la DOM à travers la boucle microbienne. Pour cela, une approche expérimentale similaire à celle utilisée lors du suivi temporel détaillé dans le chapitre précédent, mais avec un dimensionnement différent, a été utilisée. La croissance bactérienne, la consommation des substances nutritives dissoutes, la composition moléculaire de la DOM et de la structure des communautés ont été suivies. De plus en plus d'études s'intéressent à la composition moléculaire de la DOM pour estimer sa réactivité mais très peu d'études combinent la caractérisation au niveau moléculaire de la DOM et l'étude de la dynamique de la structure des communautés. La combinaison de ces deux types d'analyses confère à ce travail son originalité.

IV.2. Unraveling the major control of N-containing inorganic and organic molecules on DOM bioavailability in a Mediterranean coastal environment

Clara Dignan^{1,*}, Véronique Lenoble¹, Chiara Santinelli², Giancarlo Bachi², Huy Dang³,
Nicole Garcia⁴, Benjamin Misson¹

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

²*CNR – Institute of Biophysics, 56124 Pisa, Italy*

³*School of the Environment, Trent University, Peterborough, ON K9L 0G2, Canada*

⁴*Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, Marseille, France*

* Corresponding author.

E-mail adress: clara.dignan@univ-tln.fr

Article en préparation pour une soumission dans Limnology and Oceanography Journal.

IV.2.1. Abstract

Dissolved organic matter (DOM) and heterotrophic prokaryotes (HP) are important components of the oceanic carbon cycle. The use of DOM by HP communities is dependent on DOM bioavailability. Despite several biotic and abiotic factors (DOM quantity and quality, nutrient concentration, temperature, microbial community structure) controlling DOM bioavailability are known, however, the hierarchy of their respective influences remains a debate topic. Two contrasting Mediterranean coastal sites were chosen: a harbour (H) and an open site (O). While presenting similar dissolved organic carbon (DOC) concentrations, these sites differed in dissolved nitrogen and phosphorus concentrations as well as in DOM molecular composition analyzed by High-Resolution Mass Spectrometry. Incubation experiments were performed to expose HP communities of each site to dissolved substances from H and O for three weeks. Consumption of dissolved organic carbon (DOC) was similar regardless of the origin of HP and dissolved substances characteristics. HP growth and their maximal abundance were higher with dissolved substances from harbour than that from the open oceanic setting, suggesting a different fate of consumed DOM depending on abiotic determinants. Higher HP growth corresponded to higher initial concentrations and higher consumptions in incubation experiment of inorganic nitrogen and organic phosphorus, as well as to higher fluorescent DOM intensity. The DOM molecular composition of DOM has shown that a higher HP growth and maximal abundance was linked to the presence and consumption of nitrogen-containing molecules (proteins, amino-sugars) and carbohydrates. Differences in the initial HP community did not influence HP growth or DOC consumption. Taken together, these results provide insights into the main drivers of marine DOM bioavailability. At similar DOC concentration, a higher influence of inorganic and organic N supplies was evidenced. Conversely, we have shown that there is little influence of HP recent community history or community structure on DOM bioavailability for the studied coastal Mediterranean waters.

Keywords: Coastal ecosystem, Mediterranean Sea, dissolved organic matter, bioavailability, heterotrophic prokaryotes.

IV.2.2. Introduction

Dissolved organic matter (DOM) and heterotrophic prokaryotes (HP) are well recognized to be key components of the carbon cycle and other biogeochemical cycles in the oceans (*Kirchman, 2004*). The oceanic DOM represents the largest reservoirs of reactive organic carbon on the

Earth's surface. Given its huge inventory, any change in the rate of DOM degradation could affect atmospheric CO₂ concentration with climate consequences; the net oxidation of 1% of the DOM pool would release into the atmosphere an amount of CO₂ equivalent to the annual anthropogenic emission from fossil fuel combustion (*Hansell 2013; Le Quéré et al., 2009, 2015*).

Organic matter has an origin and a composition that inherited from its local environment. An environment gives its organic matter, through specific contributions and mechanisms, particular characteristics responsible for its unique reactivity (*Hansell and Carlson, 2001; Kim et al., 2003*). In the open oceans most of DOM comes from autochthonous production by phytoplankton (*Nagata, 2000; Jiao et al., 2010; Carlson and Hansell, 2015*). In coastal environments, allochthonous inputs from rivers, groundwater, and runoff are also significant sources of DOM (*Cauwet, 2002; Hudson and Reynolds, 2007*). In addition to natural sources, continental and maritime anthropogenic DOM are directly released into seawater or brought to the coastal sea through atmospheric deposition and freshwater inputs (*Pernet-Coudrier et al., 2008; Mostofa et al., 2010*). Once in the coastal water, DOM fate depends on biotic and abiotic degradation processes. Although abiotic processes, primarily photochemical oxidation of DOM by solar radiation (*Mopper and Kieber, 2002*), may represent important pathways, the main degradation process is related to heterotrophic prokaryotes activity (*Azam et al., 1994*). DOM is the key carbon source for marine heterotrophic prokaryotes (*Azam et al., 1983; Azam and Cho, 1987; Carlson, 2002; Lønborg et al., 2018*) and together with carbon it provides nitrogen, phosphorus and other essential elements (*Dittmar and Stubbins, 2014*). When consumed by heterotrophic prokaryotes, DOM is either used as an energy source through respiration and mineralized into CO₂, or converted into bacterial biomass, becoming available for higher trophic levels through the microbial loop (*Azam et al., 1983; Cho and Azam, 1990*). The fate of marine DOM result in the balance between biomass production and CO₂ production; this equilibrium is ultimately determined by DOM bioavailability.

The DOM pool is divided according to its bioavailability, the labile fraction is available for heterotrophic prokaryotes processing and exhibit a turnover time of minutes to days while the recalcitrant fraction escapes microbial degradation end persist in the ocean for months to millennia (*Hansell and Carlson, 2002; Hansell, 2013*). During the last three decades, marine DOM bioavailability has been demonstrated to depend on (i) intrinsic molecular properties (*Del Giorgio and Cole, 1998; Kowalczyk et al., 2013; Carlson and Hansell, 2015; Dittmar, 2015; Shen and Benner, 2020*), (ii) microbial community structure (*Pedler et al., 2014; Roller and Schmidt, 2015; Song et al., 2017*), (iii) environmental conditions such as temperature (*Pomeroy*

and Wiebe, 2001) or (iv) concentrations of inorganic nutrients (*Thingstad et al., 1997; Del Giorgio and Davies, 2003; Nieto-Cid et al., 2006*). Recently, all these studies enabled an ecosystemic and dynamic perception of DOM bioavailability: living and non-living compartments interact with each other depending on environmental characteristics (*Dittmar et al., 2021*). These factors have been widely investigated to understand and predict microbial carbon fluxes. Nevertheless, they were individually studied in most cases but rarely simultaneously. It is, therefore, necessary to consider these factors together to better predict DOM lability, its fate and the resulting consequences on the carbon cycle and the marine ecosystem.

The objective of this work was to observe in parallel dissolved substances and heterotrophic prokaryotes temporal dynamics to hierarchize the main drivers of DOM lability in coastal marine environments. We develop an experimental approach to consider altogether: (1) DOM elemental and molecular properties; (2) the stoichiometry of nutrients; (3) the taxonomic diversity of different communities. We conducted laboratory experiments with two natural pools of dissolved substances presenting similar dissolved organic carbon (DOC) concentrations but diverging in terms of DOM composition and inorganic nutrient availability. We incubated these pools with two different microbial communities presenting contrasted short-term life histories and taxonomic structures. Changes in abundance of heterotrophic prokaryotes, taxonomic structure of the prokaryotic communities, concentrations in DOC, dissolved organic nitrogen (DON), dissolved organic phosphorus (DOP), dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved inorganic phosphorus (DIP), fluorescent properties of DOM and molecular composition of the solid phase extracted (SPE) DOM pool were measured along a 22-day-long experiment.

IV.2.3. Material and methods

IV.2.3.1. Sample collection

Surface water samples were collected from two contrasting sites on May 25, 2021, using a Van-Dorn bottle and transferred in a 20L LDPE bottles. The civil harbour of Toulon ("H", 43°118460; 5°934092) was chosen as the first study site due to its typical specificities: urbanism, low tides, hosting leisure boats as well as fishing activity. Its location within the highly contaminated Toulon Bay provided an opportunity to observe exacerbated anthropogenic influences (*Coclet et al., 2018*). We chose another coastal location strongly connected to the land but with low anthropogenic influence. This site was located in Niel Bay

on the Giens peninsula (“O”, 43°035325; 6°127527), within the Port-Cros National Park. This site is located about ten kilometers from Toulon bay, exposed to similar climatic conditions but in an area open to the sea and continuously stirred by the currents. All the material used during sampling and experimentation has undergone a washing and conditioning protocol before use in order to avoid any contamination (see supplementary material). During sampling, water temperature, salinity and chlorophyll a were measured using a multiparameter probe (Hydrolab® DS5X). In order to avoid any major change in DOM properties and prokaryotic communities, the samples were brought back in the laboratory within 2 hours and immediately processed in order to launch the experiments as soon as possible.

IV.2.3.2. Experimental design

The experiments consisted of incubating each pool of dissolved substances to the HP community of the same sampling site, for a representative evaluation of DOM bioavailability while minimizing manipulations. The experimental conditions were named “HinH” for the harbour community in its own dissolved substances and “OinO” for the open site community in its own dissolved substances. Then, each DOM pool was also incubated with the HP community of the other site to evaluate the consistency of DOM bioavailability. The conditions were named “HinO” for the harbour community in the dissolved substances from the open site and “OinH” for the open site community in the dissolved substances from the harbour. This resulted in 4 experimental conditions, each being triplicated. For each replicate, 1.8L of filter-sterile seawater (< 0.2 µm, polyestersulfone filter, Whatman, 47mm) containing the dissolved substances was inoculated with 0.2L of seawater containing the HP community (< 0.7 µm, GF/F filter, Whatman, 47mm) in 2L fluorinated ethylene propylene (FEP) bottle. All bottles were then incubated at *in-situ* temperature (15°C) and in darkness (to avoid photosynthetic DOM production) for 22 days. To follow the growth of HP, subsamples were taken immediately after inoculum (T₀) and after 1, 2, 4, 8, 10, 15 and 22 days of incubation. To follow dissolved organic carbon (DOC) and nutrients concentration as well as DOM molecular composition, subsamples were taken at T₀ and at the end of incubation (T₂₂). To evaluate fluorescent DOM (FDOM) and HP community composition, subsamples were taken at T₀, after 4 days of incubation (T₄) to target the development of opportunists and at T₂₂. The 2L bottles were opened and mixed before each subsampling, which was carried out taking the necessary precautions to avoid any contamination by ambient microbes. All subsampling material used has been previously conditioned (See supplementary material).

IV.2.3.3. EEM-PARAFAC analyses, DOC and nutrient concentrations

Subsamples of 24 mL were filtered through 0.2 μm polyestersulfone (PES, 33 mm) syringe filters, collected in preconditioned glass tubes, acidified (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) and stored at 4°C waiting for DOC concentration measurement. DOC concentrations were determined by high temperature catalytic oxidation using a Shimadzu TOC-VCSN carbon analyser following the method reported by Santinelli et al. (2015). From 3 to 5 repeated injections were performed until the analytical precision was lower than 2% ($\pm 1 \mu\text{M}$). A five-point calibration curve was carried out with standard solutions of potassium hydrogen phthalate in order to convert the signal of the CO_2 into $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (μM). At the beginning and the end of each analytical day, the system blank was measured using Milli-Q water and the reliability of measurements was checked by comparison with a DOC consensus reference material (CRM) (CRM Batch #20; nominal concentration of $42.05 \pm 1.2 \mu\text{M}$; measured concentration $41.55 \pm 0.7 \mu\text{M}$, $n = 112$) (Hansell, 2005).

Following the same filtration protocol as for DOC measurement, 24 mL of filtered water were stored in preconditioned glass tubes at 4°C for further FDOM evaluation. The composition of DOM fluorescent fraction was analysed immediately after subsampling. The fluorescence excitation-emission matrices (EEMs) were recorded using a Aqualog spectrofluorometer (Horiba) following the method reported by Retelletti Brogi et al. (2020). EEMs are used to distinguish fluorescence signals due to various groups of chromophores. The excitation wavelength varied between 220 and 450 nm in 5 nm increments, while the emission was measured between 220 and 600 nm. Using the drEEM toolbox (Murphy et al., 2013), EEMs were built to suppress and interpolate Rayleigh and Raman scattering peaks, normalize fluorescence intensities to Raman units, and perform parallel factor analysis (PARAFAC, MATLAB R2018a (Mathworks, Natick, MA)). The final four-component model was validated by visual inspection of residuals, split-half analysis and the percentage of explained variance (Stedmon and Bro, 2008). The four fluorescent DOM (FDOM) components identified were $\text{C1}_{\text{MarHum-like}}$ (humic-like component, Ex/Em: 295nm/400nm), $\text{C2}_{\text{TerHum-like}}$ (humic-like component, Ex/Em: 365nm/465nm), $\text{C3}_{\text{Tyr-like}}$ (protein-like component, Ex/Em: 260nm/312nm), $\text{C4}_{\text{Trp-like}}$ (protein-like, Ex/Em: 280nm/338nm). $\text{C1}_{\text{MarHum-like}}$ component is similar to humic-like M peak, which is widely observed in coastal water with high microbial activity (Coble, 1996; Stedmon et al., 2011). $\text{C2}_{\text{TerHum-like}}$ component is considered as a terrestrially derived humic-like products (Coble et al. 2014). $\text{C3}_{\text{Tyr-like}}$ component overlaps the

peak T for tyrosine protein-like sources (*Coble, 1996*). C₄^{Trp-like} component is similar to Tryptophan protein-like T peak (*Coble, 1996*).

For nutrient concentration measurements, subsamples (50 mL) were filtered through 0.2 µm PES (33 mm) syringe filters, collected in centrifuge tubes (Falcon) and stored at -20°C. Nutrient concentrations (nitrate, nitrite et phosphate) were measured by colorimetric methods using an automated Technicon Autoanalyser III (*Tréguer and Le Corre, 1975*) and total element concentrations (total nitrogen TN and total phosphorus TP) were determined using the wet-oxidation technique (*Raimbault et al., 1999*). Dissolved organic nitrogen (DON) and phosphate (DOP) concentrations were deduced by subtracting the nitrate and nitrite concentrations from total nitrogen concentration and the phosphate concentration from the total phosphorus concentration, respectively. The elemental DOC/DON and N/P ratios were calculated by dividing the dissolved organic carbon concentration by dissolved organic nitrogen concentration and the total nitrogen concentration by total phosphate concentration, respectively.

IV.2.3.4. DOM molecular characterization and data processing

One liter of water sampled at T₂₂ was filtered through 0.2 µm pore filter (PES filter, Whatman, 47mm) and collected in 1L FEP bottles. It was then acidified to pH 2 with HCl (32%, puriss p.a. grade). According to the manufacturers guidelines, the extraction cartridges Bond Elut PPL (Agilent) were activated the day before the extraction by soaking them with methanol (p.a. grade). Immediately before use, the extraction cartridges were rinsed with 2 fillings of MilliQ 18.2 MΩ water, methanol and acidified MilliQ 18.2 MΩ water (pH 2). The subsamples of 1L were gravity-filtered through the cartridges at flow rates not exceeding 20 mL.min⁻¹. The subsample bottles were connected to cartridges the with Teflon tubings (ID 2 mm) and Luer adaptors. The cartridges were rinsed with at least 3 cartridge volumes (18 mL) of acidified Milli-Q water (pH 2) for complete removal of salt. Sorbents were dried with ultrapure nitrogen gas for about 5 min, and DOM was immediately eluted with 7 mL of methanol in 24 mL glass tubes. The eluates were stored at 4°C until further analyses (*Dittmar et al, 2008; Shen et al., 2016*).

DOC concentrations were measured at the inlet and at the outlet of the cartridge to evaluate column recovery (ca. 60% of the total DOC was recovered by the cartridges). The molecular characterization of these extracts was carried out using high-resolution mass spectrometry (HRMS), e.g., Orbitrap Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) in infusion mode at the Water

Quality Centre (Trent University, Canada). Negative $[M - H]^-$ ions were examined at a resolving power of 140000, using a full MS scan ranging from 100 to 1000. The capillary temperature was set at 320°C and the voltage of sputtering was maintained at 3000 V. The sheath gas pressure was 12 (arbitrary unit). The solution injected (at 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) was diluted to a concentration of 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in a mixture of MilliQ 18 M Ω water and methanol (50/50, v/v). Prior to analysis, a routine mass calibration was performed with Pierce™ LTQ ESI Positive/Negative Ion Calibration Solution (88322/88324, ThermoFisher Scientific). Samples were spiked with sodium dodecyl-d25 sulfate (m/z 290.3048) and dioctylsodium sulfosuccinate (m/z 421.2265) as lock masses to ensure ppm-level mass tolerance.

Molecular formulas were assigned using the open access, browser-based software UltraMassExplorer (UME; <https://ume.awi.de>; *Leefmann et al., 2019*). The assignments were based on a library of pre-built “02-NOM” molecular formulas. Elementary selection of $^1\text{H}_{1-\infty}$, $^{12}\text{C}_{1-\infty}$, $^{14}\text{N}_{0-4}$, $^{16}\text{O}_{0-\infty}$, $^{32}\text{S}_{0-1}$, $^{31}\text{P}_{0-1}$ has been applied. User-defined mass tolerance and mass precision have been set to 1 ppm and four decimal places, respectively. An analytical filter (remove the formula not verified by ^{13}C , ^{34}S and ^{15}N isotopes) and a ratio filter ($\text{O}/\text{C} \leq 1.2$, $\text{H}/\text{C} \leq 2.5$) were also applied. The assigned molecules were classified into eight classes of compounds or 12 elementary combinations. Classes of biochemical compounds are reported as relative abundance values based on C, H, and O counts for the following H:C and O:C ranges: lipids ($0 < \text{O}:\text{C} \leq 0.3$, $1.5 \leq \text{H}:\text{C} \leq 2.5$), unsaturated hydrocarbons ($0 \leq \text{O}:\text{C} \leq 0.125$, $0.8 \leq \text{H}:\text{C} < 2.5$), proteins ($0.3 < \text{O}:\text{C} \leq 0.55$, $1.5 \leq \text{H}:\text{C} \leq 2.3$), amino sugars ($0.55 < \text{O}:\text{C} \leq 0.7$, $1.5 \leq \text{H}:\text{C} \leq 2.2$), carbohydrates ($0.7 < \text{O}:\text{C} \leq 1.5$, $1.5 \leq \text{H}:\text{C} \leq 2.5$), lignin ($0.125 < \text{O}:\text{C} \leq 0.65$, $0.8 \leq \text{H}:\text{C} < 1.5$), tannins ($0.65 < \text{O}:\text{C} \leq 1.1$, $0.8 \leq \text{H}:\text{C} < 1.5$), carbohydrates ($0.7 < \text{O}:\text{C} \leq 1.2$, $1.5 \leq \text{H}:\text{C} \leq 2.5$) and condensed hydrocarbons ($0 \leq \text{O}:\text{C} \leq 0.95$, $0.2 \leq \text{H}:\text{C} < 0.8$) (*Kim et al., 2003; Minor et al., 2014*). The elementary combinations were CH, CHN, CHNO, CHNOP, CHNOS, CHNOPS, CHNS, CHO, CHOP, CHOS, CHOPS and CHS (*Rivas-Ubach et al., 2018*). The intensity of a measured compound has been transformed into frequency in order to allow the comparison among the samples.

A molecular lability boundary (MLB) was developed to divide the ultrahigh-resolution mass spectrometry molecular data into two groups encompassing more or less labile material, derived from calculated hydrogen saturation molecular values (*D’Andrilli et al., 2015*). DOM constituents above the MLB at $\text{H}/\text{C} \geq 1.5$ correspond to more labile material in more bioavailable chemical class regions (grouping in protein-, amino sugar-, carbohydrate-, lipid-like regions of the van Krevelen diagram), whereas DOM constituents below the MLB, $\text{H}/\text{C} < 1.5$, exhibit less labile, more recalcitrant character (grouping in more lignin-, tannin-,

and condensed aromatic-like regions of the van Krevelen diagram) over all O/C ratios (*Kim et al., 2003; Chipman et al., 2010; Minor et al., 2014; D'Andrilli et al., 2015*). The percentage of more labile or recalcitrant constituents is determined by summing the molecule frequencies categorised with a ratio, respectively, $H/C \geq 1.5$ or $H/C < 1.5$ over all O/C (0.0 – 1.2) multiplied by 100. These calculations are defined as chemical species richness for more labile or more recalcitrant contributions (MLB_L and MLB_R).

IV.2.3.5. Biological analysis

IV.2.3.5.1 Abundance, flow cytometry

Dedicated 1 mL subsamples were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes, fixed with glutaraldehyde (0.25% final concentration), and stored at -80°C prior to HP enumeration by flow cytometry. After thawing, samples were stained with SYBR Green (1X final concentration) for 15 minutes in the dark and HP were counted with an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). Fifty μL were run at a flow rate of 35 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Non-fluorescent polystyrene microspheres (Flow Cytometry Size Calibration Kit, Thermo Fisher Scientific) were used as a size standard. Particles considered as HP were smaller than 2.0 μm , exhibited low complexity (low SSC), emitted green fluorescence and no red fluorescence (*Grégori et al., 2001*). Data were acquired using BD Accuri CFlow Plus software and heterotrophic prokaryotes abundance (HPA) expressed as cells per milliliter ($\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$).

IV.2.3.5.2 Taxonomic diversity, metabarcoding

To study HP community structure, HP were collected by filtering 60 mL subsamples through a 0.2 μm pore filter (Whatman, 47 mm) and the membrane filters were stored at -4°C until further processing. After thawing, they were cut with sterile scissors into small pieces, immersed in 750 μL of sterile saline TSE buffer (50 mM Tris-HCl, 750 mM sucrose, 20 mM EDTA, 40 mM NaCl, pH = 9.0) and horizontally vortexed for 5 min at ambient temperature. Cell lysis was performed with lysozyme, SDS and proteinase K as reported elsewhere (*Boström et al., 2004*). DNA was precipitated in 70 % ethanol, 0.1 M sodium acetate (pH = 5.2) and linear polyacrylamide (Genelute-LPA, Sigma-Aldrich) (*Gaillard et al., 1990*). After 2 rinsing steps with 70% ethanol, DNA pellets were air-dried, resuspended in Milli-Q water and stored at -20°C. Amplification of the V4-V5 region of 16S rRNA gene targeting bacteria and archaea was performed with primers 515F-Y/926R (*Parada et al., 2016*). Reaction mixtures contained 10 μL of DNA extract, 2X GoTaq Long PCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) and

0.4 μM of each primer, in a final volume of 60 μL . The PCR program included an initial heating step of 2 minutes at 95°C followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 50°C for 45 seconds and 72°C for 45 seconds, and a final extension of 2 minutes at 72°C. PCR amplification efficiency and specificity were checked after migration of 5 μL of PCR products on a 1.5% agarose gel. After purification (Nucleospin Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel), PCR products were paired-end sequenced (2 \times 300 bp) with an Illumina Mi-Seq sequencer by Eurofins (Germany). Sequencing reads were deposited in the National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive (NCBI SRA) under the accession number PRJNA952911. MiSeq raw reads were analysed with *DADA2* (Callahan *et al.*, 2016) in RStudio 2022.7.0.548 (RStudio Team, 2022) under R 4.2.0 environment. Sequences were trimmed according to average Q-scores, then filtered allowing no N, no more than 2 expected errors whatever the read (i.e., forward or reverse), and a minimal Q-score of 3. Taxonomic information was assigned to ASVs with the SILVA v.138 database (Pruesse *et al.*, 2007; Quast *et al.*, 2013). Sequences classified as mitochondria or chloroplasts were removed from the dataset. Extraction and amplification negative controls were sequenced, in case of contamination, the amplified groups were removed from the other samples dataset. One sample (OinH after 4 days of incubation) was also removed from the dataset because it did not have enough sequences.

IV.2.3.6. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with RStudio 2022.7.0.548 software (RStudio Team, 2022) under R 4.2.0 environment. All comparisons between initial and final incubation times of each condition were done by Mann Whitney non parametric test of the *vegan* package. All the differences presented as significant in this article had confidence interval of 95%. After verifying the normal distribution and homoscedasticity of the variances with Shapiro and Levene tests, respectively, analyses of variance (ANOVA) were used to compare fluorescence intensity values and HPA values between each incubation time and each condition using *rstatix* package. If the ANOVA detected a significant difference, pairwise comparisons of estimated marginal means with the Bonferroni method for the p-value correction was then used to distinguish which condition differed significantly between the incubation times and between the other conditions.

With ultra-high resolution mass spectrometry data, the fold-change of each condition was calculated by taking the log 2 of the ratio between the data of a condition at the final and initial

time. The significance of the temporal variation was assessed using the Mann Whitney non-parametric test of the *vegan* package. The significance of temporal variability versus fold-change of the identified molecules was represented with volcano plots using *dplyr* package (*Figure S.I. IV.8*). Molecules showing significant variations were used to construct Van Krevelen diagrams, using *ggplot2* package, representing the molecules either significantly consumed or significantly produced in each experimental condition.

With metabarcoding data, “heat trees” were generated using *metacoder* package (*Foster et al., 2017*) to pairwise-compare the conditions and identify the taxa most strongly driving the compositional differences. Alpha diversity calculations (Shannon) were performed using *phyloseq* package (*McMurdie & Holmes, 2013*). For community profiling, beta-diversity based analysis of similarities on Unifrac distances was calculated using the *phyloseq* (*McMurdie & Holmes, 2013*) and *vegan* (*Oksanen et al., 2013*) packages. Results were plotted on a principal coordinate analysis (PCoA) graph. Graphical representations were performed using *ggpubr* and *ggplot2* packages.

IV.2.4. Results

The *in situ* seawater temperature at the open site (“O”) and the harbour area (“H”) was similar and close to 15°C. The salinity was lower by 3 units at H. The chlorophyll-a was 5 times more concentrated at H than at O. All physical-chemical parameters initially measured on the two sites are provided in the supplementary material (*Table S.I. IV.1*).

DOC concentrations measured at O (106.4 µM) were similar to those measured at H (105.4 µM). During the incubation, DOC concentrations significantly decreased in all conditions to reach similar final values (*Figure IV.1.A*). Initial phosphate concentrations measured at both O and H were very low (0.01 µM and 0.03 µM, respectively). At T₂₂, while phosphate concentration appeared unchanged in the conditions with HP community of the open site, a significant increase was observed in the conditions with HP community of the harbour (*Figure IV.1.B*). The initial nitrate and nitrite concentrations were about 70 times more concentrated at H (18.50 µM and 2.11 µM, respectively) than at O (0.26 µM and 0.03 µM, respectively). After 22 days of incubation, the nitrate and nitrite concentrations significantly decreased under the conditions with the dissolved substances from H and remained low during the incubation under the conditions with the dissolved substances from O (*Figure IV.1.C and D*). DOP was initially more concentrated at H (0.25 µM) than at O (0.14 µM). After 22 days of incubation, DOP concentration was similar between all the conditions, indicating twice as much

consumption in the conditions with dissolved substances from H than those with dissolved substances from O (*Figure IV.1.E*). Conversely, the concentrations of DON measured at O (6.36 μM) were similar to those measured at H (5.48 μM). However, after 22 days of incubation, DON concentration was twice lower under the conditions with dissolved substances from O (*Figure IV.1.F*).

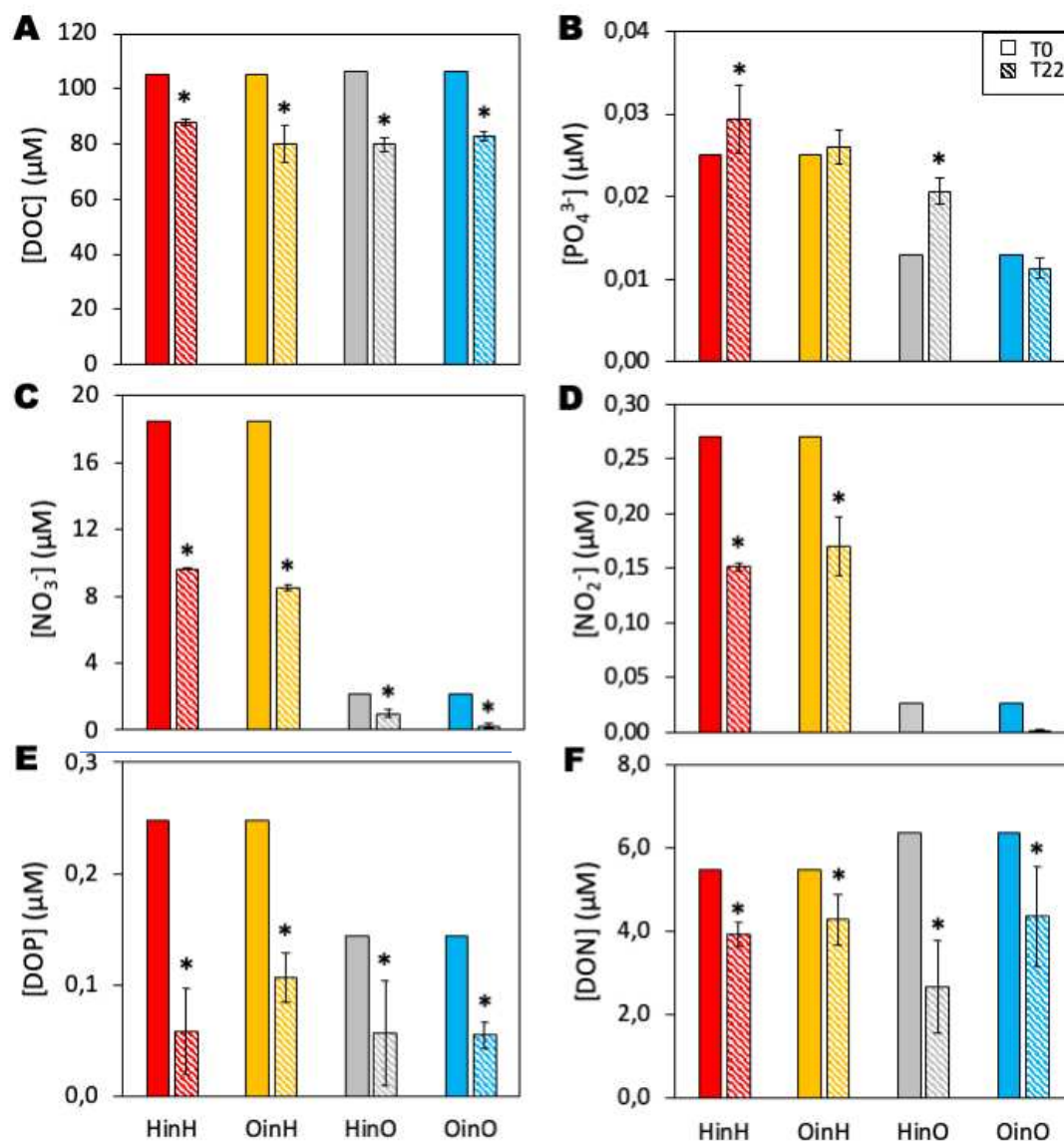


Figure IV.1: Comparison of the abiotic parameters dynamics at the initial (filled colours) and final (fine hatch) time of the incubation experiment for each condition. (A) Dissolved organic carbon (DOC) concentrations, (B) phosphate (PO_4^{3-}) concentrations, (C) nitrate (NO_3^-) concentrations, (D) nitrite (NO_2^-) concentrations, (E) dissolved organic phosphate (DOP) concentrations, (F) dissolved organic nitrogen (DON) concentrations. Error bars denote standard deviation of triplicated experiments. The stars represent a significant difference between initial and final incubation time.

The fluorescence intensity of different components was less than or equal to 0.025 Raman Unit (R.U.) in the open site and greater than or equal to 0.039 R.U. in the harbour (*Figure IV.2*). Under condition OinO, it remained stable during the first 4 days of incubation while between 4 and 22 days of incubation, a significant increase was observed for all the components except for C4_{Trp-like} (*Figure IV.2*). For the condition HinO, the fluorescence intensity of C2_{TerHum-like} and C4_{Trp-like} remained unchanged during the incubation. However, that of C1_{MarHum-like} and C3_{Tyr-like} significantly increased during the first 4 days of incubation before stabilizing. Under the conditions with dissolved substances from H (HinH and OinH), the fluorescence intensity of all the PARAFAC components significantly decreased after 4 days of incubation while between 4 days and 22 days of incubation, it remained stable (*Figure IV.2*).

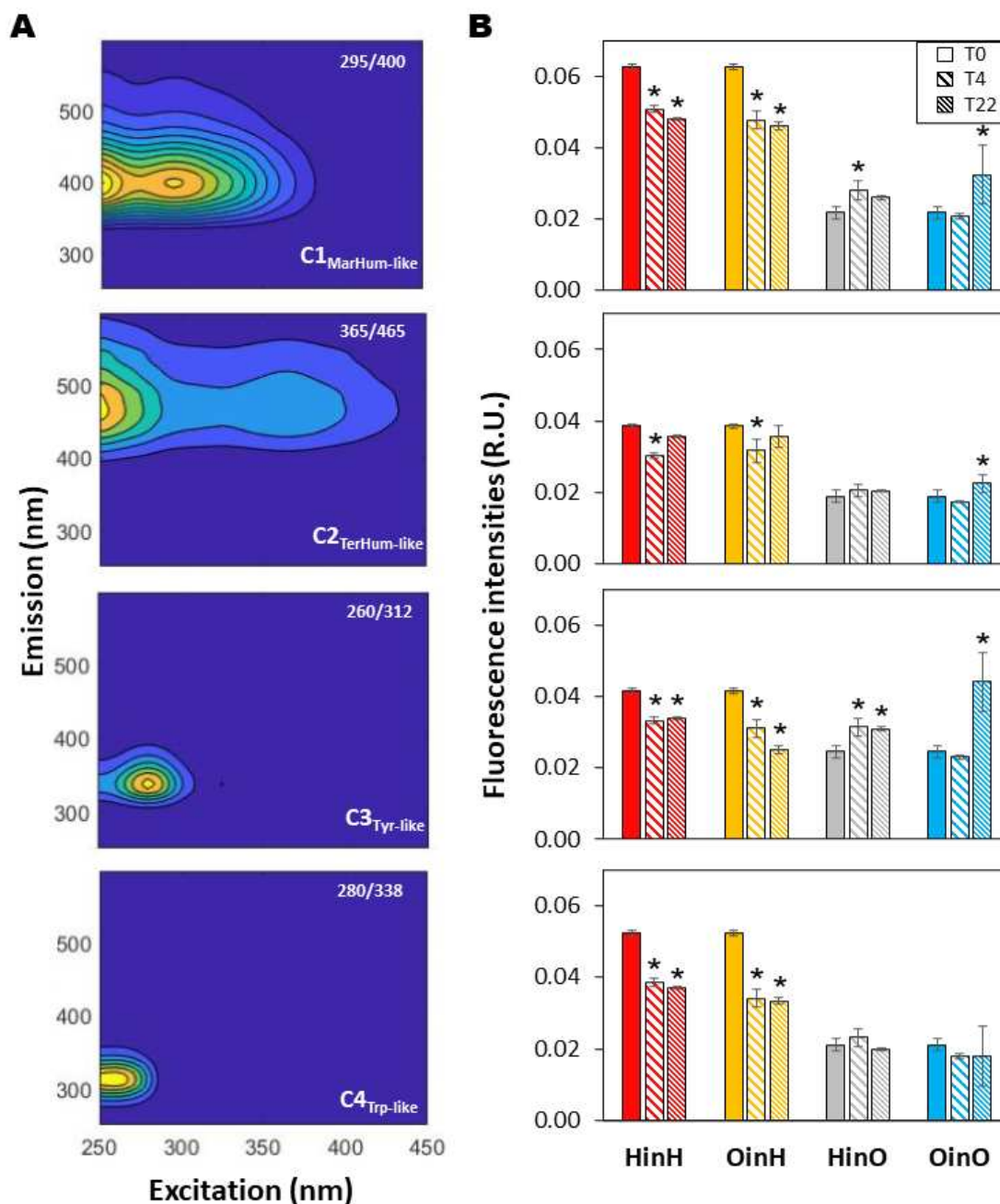


Figure IV.2: (A) Fluorescence signatures of the four PARAFAC identified components: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 Tyrosine-like. Contour plots of components C1 – C4 are ordered by decreasing percent explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing the relative intensity of emission. (B) Relative changes of fluorescent intensity at the beginning (filled colours), after four days (large hatch) and at the end (fine hatch) of the incubation for each condition. The stars represent a significant difference with initial incubation time.

HRMS analysis identified 5,551 molecules in the different samples. According to the H:C ratio of each molecular formulae, both sites contained more theoretically labile molecules ($\geq 69\%$) than recalcitrant ones (*Figure IV.3 and Figure S.I. IV.9*). Harbour DOM was enriched in labile compounds compared to the open site (*Figure IV.3*). At the final time of the incubation, a significant decrease in theoretically labile molecules was recorded in the conditions with the dissolved substances from H but not in the conditions with the dissolved substances from O. However, the fraction of these molecules remained higher than 65% in all conditions. Two heteroatomic molecular group of species containing oxygen, nitrogen and sulphur (CHNOS) or oxygen, nitrogen and phosphorus (CHNOP) significantly contributed to the labile character of DOM (~ 20 and 50% of each initial DOM pool, respectively). During the incubation, CHNOP showed a significant decrease from 2 to 4% in all the conditions. CHNOS also significantly decreased by 3% in the conditions with the dissolved substances from H but remained unchanged in the conditions with the dissolved substances from O.

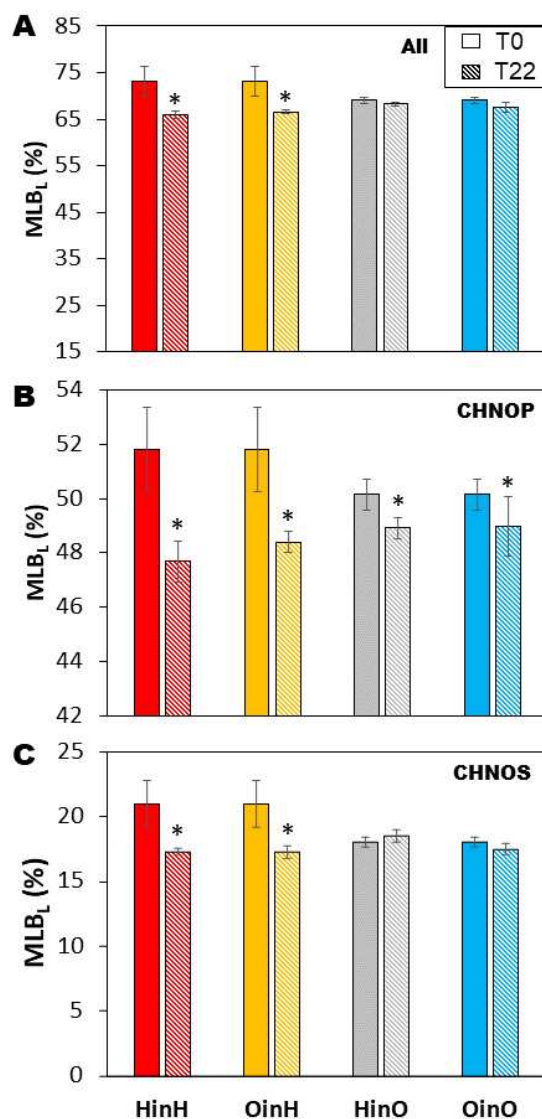


Figure IV.3: Percentage of labile compounds of the dissolved organic matter in each condition at the initial (filled colours) and final (fine hatch) incubation time determined according to the molecular lability boundary (MLB) among (A) all elementary formulas combined, (B) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and phosphate (CHNOP) and (C) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulphate (CHNOS). Error bars denote standard deviation of triplicate analyses.

Initial DOM from the harbour area was enriched in protein compounds, carbohydrates and amino sugars while DOM from open area was preferentially composed of lignin-like compounds (Figure S.I. IV.10). Principal coordinate analysis strongly discriminated DOM molecular composition at the initial and final incubation times with dissolved substances from H in the first dimension, indicating more temporal variation for DOM from H during the experiment than spatial differences between the initial natural DOM pools. DOM molecular

composition of dissolved substances from H and O, both at the beginning and the end of the experiment, were well discriminated in the second dimension (*Figure S.I. IV.11.A*). In the incubation with dissolved substances from H, 254 to 260 organic molecules were significantly consumed, and 51 to 90 molecules were significantly produced. In the incubation with dissolved substances from O, the variations differed depending on the community used. For OinO, 39 molecules were significantly consumed, and 9 molecules were produced while for HinO, 210 molecules were consumed, and 26 molecules were produced.

According to the Van Krevelen diagram (*Figure IV.4*) and the percentage of molecules consumed in the different molecular groups (*Figure S.I. IV.12*), lignin ($35.6 \pm 11.2\%$) and unsaturated hydrocarbons ($19.1 \pm 2.0\%$) were the most consumed molecular groups in the conditions with dissolved substances from O. It is noteworthy that a significant consumption of proteins (2.8%) and amino sugars (12.8%) was observed in HinO condition but not in OinO. Under these conditions, the most produced molecular groups were unsaturated hydrocarbons ($26.3 \pm 9.9\%$) and lignin ($18.8 \pm 4.8\%$). More carbohydrates were produced in HinO condition (30.8%) than in OinO condition (11.1%). Proteins were produced more in OinO condition (33.3%) than HinO condition (3.8%, Fig. S.I.5). Few significantly produced compounds were actually detected in OinO with respect to the other conditions (*Figure IV.4*).

Under the conditions with dissolved substances from H, the most consumed molecular groups were carbohydrates ($34.6 \pm 3.3\%$), proteins ($18.2 \pm 2.9\%$) and amino sugars ($15.2 \pm 3.3\%$) were the most consumed molecular groups (Fig. 4). Among these molecular groups, a wide variety of molecules were consumed but in small quantities. Under these conditions, the most produced molecular groups were carbohydrates ($16.0 \pm 8.7\%$) and lignin ($65.1 \pm 10.4\%$) (*Figure IV.4 and Figure S.I. IV.12*).

Among the molecules significantly consumed, for all the conditions, most of these molecules contained 2 or 4 nitrogens, $60.1 \pm 4.7\%$ contained a phosphorus and approximately 50% contained a sulphur (*Figure S.I. IV.13*).

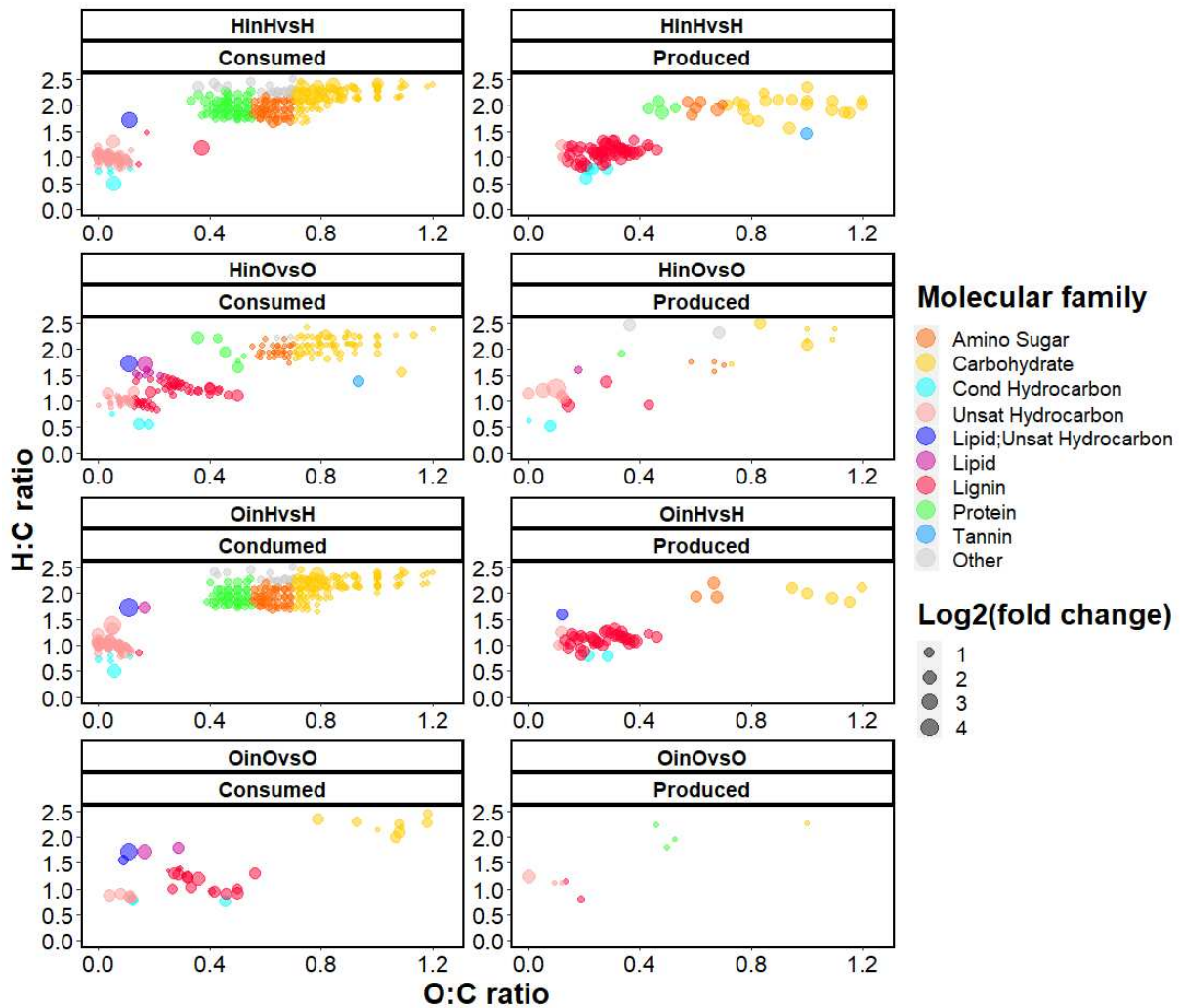


Figure IV.4: Van Krevelen diagram showing the dynamics of the molecules composing dissolved organic matter under each condition. The left panels represent the molecules significantly consumed during the incubation while the right panels represent the molecules significantly produced during the incubation. The molecules are coloured according to their molecular family. The size of the dots is proportional to the variation factor of a molecule between the initial and final incubation time.

During the dilution experiments, heterotrophic prokaryotes abundance (HPA) increased in all conditions. Several growth phases were observable: an exponential growth phase during up to 4 days of incubation, then the HP growth slowed down and the abundance remained stable when the community had reached the carrying capacity of the system (Figure IV.5). The use of dissolved substances from H resulted in an up-to-10-times higher (p-value < 0.05) increase in HPA than dissolved substances from O, independently the community origin.

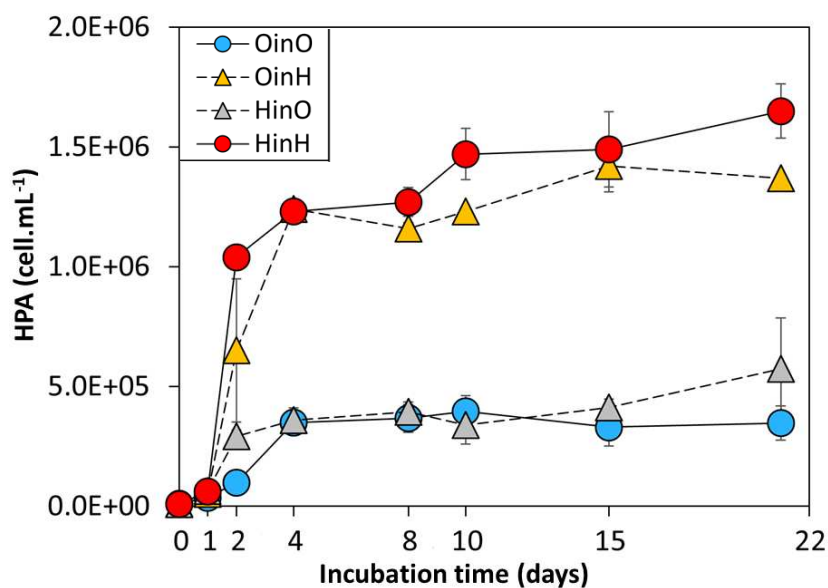


Figure IV.5: Heterotrophic prokaryotes abundance (HPA) for each condition during the incubation experiment. Errors bars refer to the standard deviation among the replicates.

Initially, the Shannon index was significantly higher for the community from O than for the one from H. A significant decrease in the Shannon index was then recorded after 4 days of incubation in all conditions. After 22 days of incubation, the Shannon index had risen again in the conditions with the dissolved substances from H while it remained low in the conditions with the dissolved substances from O (*Figure IV.6.A*).

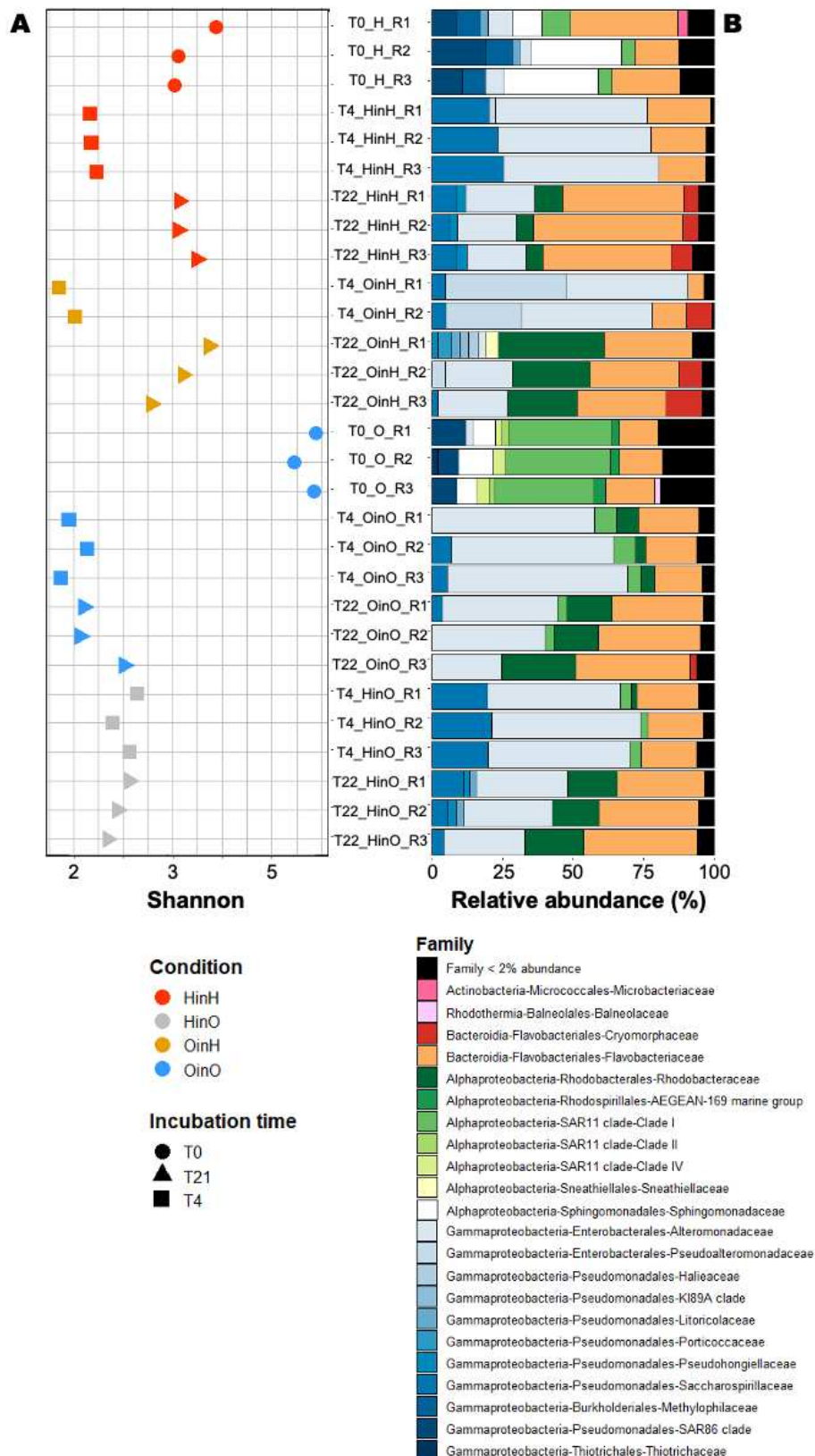


Figure IV.6: (A) Shannon index values calculated from 16SrRNA OTU table for each condition at initial incubation time (circle), after four days of incubation (square) and at final incubation time (triangle). (B) Structure of procaryotic community at the family level for each condition. Each bar represents the relative abundance of family in the studied samples.

Unifrac distance analysis strongly discriminated HP community structure between the initial incubation time and the T4 and T22 incubation times (*Figure S.I. IV.11.B*) and revealed a secondary discrimination of the HP community structure at the end of the experiment. Unlike the OinO condition, community structure in the condition HinO was not significantly different from conditions with dissolved substances from H.

The most abundant prokaryotic phyla were Proteobacteria (50.6% of total reads), and Bacteroidota (17.9% of total reads). Archaea were poorly represented in the dataset. Initially, prokaryotic communities from O were dominated by families of the SAR11 Clade 1 (Alphaproteobacteria, 36.0%) and Flavobacteriaceae (Bacteroidota, 15.4%) while prokaryotic communities from H were dominated by Flavobacteriaceae (25.7%), Sphingomonadaceae (Alphaproteobacteria, 25.4%) and families from the SAR86 clade (Gammaproteobacteria, 12.8%) (*Figure IV.6.B*). After 4 days of incubation, the relative abundance of Alteromonadaceae (Gammaproteobacteria) sharply increased from 1-6% to 45-60% and dominated in all conditions.

However, the heat tree performed on the taxonomy of the two most extreme conditions (OinO and HinH) revealed differences in community structure during incubation (*Figure IV.7*). This heat tree emphasizes the development of Pseudomonadales (Gammaproteobacteria) and Flavobacteriaceae (Bacteroidota) with dissolved substances from H that promoted the highest HP growth. Indeed, under the conditions with dissolved substances from H, the relative abundance of Flavobacteriaceae was maintained after 4 days of incubation (9 to 20%) and was the second dominant group after Alteromonadaceae (*Figure IV.6.B*). In contrast, dissolved substances from O promoted the development of Rhodobacterales (Alphaproteobacteria), whose abundance was initially <1% (*Figure IV.6.B*) and some Enteromonadale, while the decrease of the initially abundant clade SAR11 appeared limited (*Figure IV.7 and S.I. IV.14*).

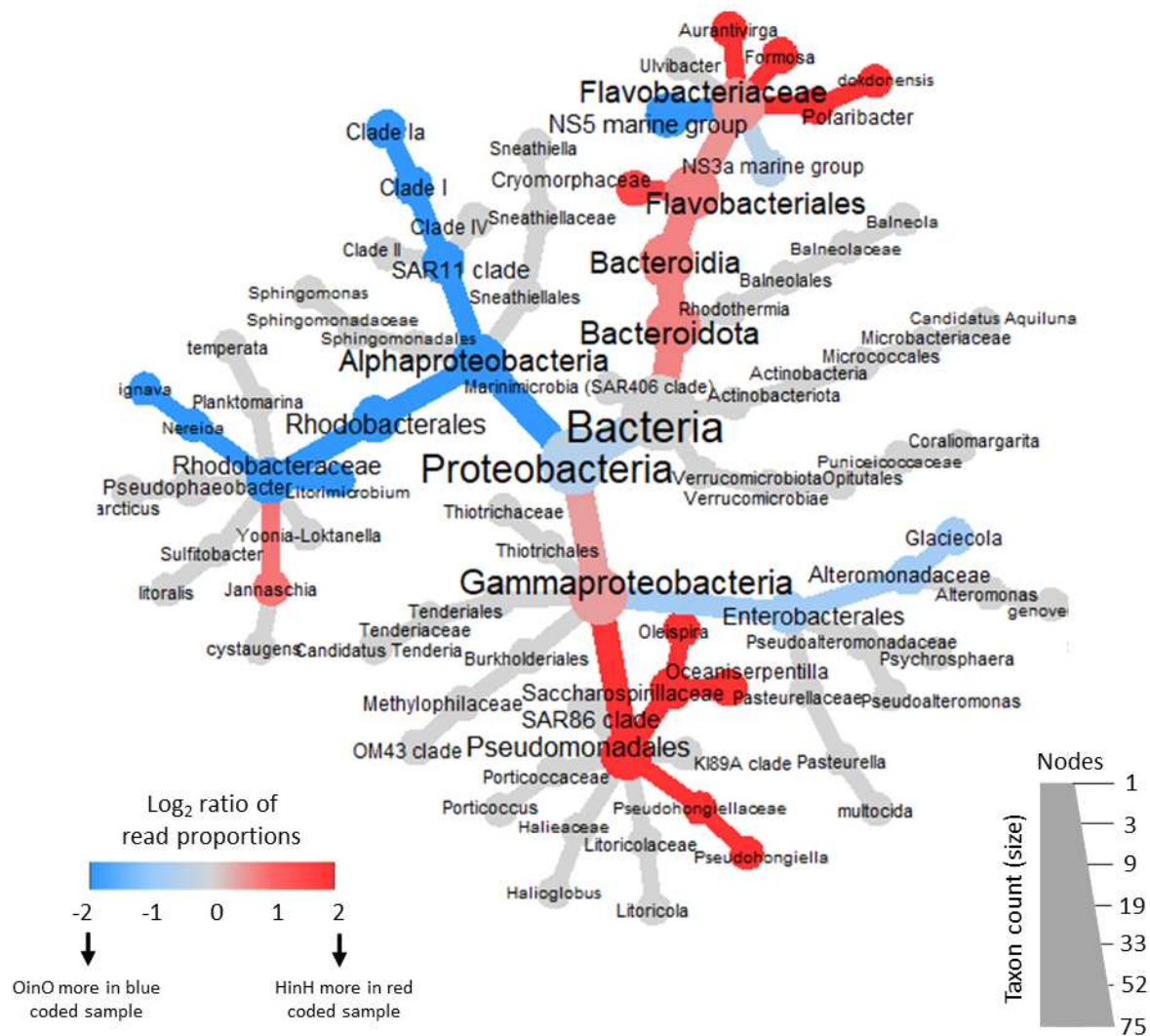


Figure IV.7: Heat tree illustrating the overall taxonomy of the heterotrophic procaryote community of OinO condition (open area community in its own water) relative to that of HinH condition (harbour community in its own water). Only taxa with a relative abundance greater than 1% were considered in the construction of the heat tree. Nodes represent taxonomic levels and branches represent the affiliations. Color changes represent the difference in log₂ ratio of median proportions of reads between OinO and HinH conditions. The blue nodes are more represented in the OinO condition, while red nodes are more represented in the HinH condition. The gray nodes appear equally in both conditions.

IV.2.5. Discussion

IV.2.5.1. DIN and DOP influence DOM fate under equivalent DOC concentration

In this study, the average DOC concentrations at the two sampled sites were in line with values commonly found in surface coastal waters of the Mediterranean Sea (*Santinelli, 2015; Coclet et al., 2019*) and similar to those found in the gulf of Lions (*Carlson and Hansell, 2015*). No significant difference in DOC concentration was observed between the two sampling sites, and no difference in DOC consumption was observed during the incubations, suggesting similar DOM bioavailability for the two studied pools. However, large differences in HP growth were observed, suggesting different DOM fate.

A clear and rapid opportunistic HP growth was observed during the first 4 days of incubation in all conditions (*Figure IV.5*). This growth reflected the net assimilation of the most labile fraction of DOM by opportunistic HP. After 4 days of incubation, the experimental systems seemed to reach their carrying capacity since the HP abundance remained stable until the end of the incubation. The maximal HP abundance appeared on average 10 times higher when HP were exposed to harbour dissolved substances, than with dissolved substances from the open site. This observation was consistent among replicates and with two different microbial communities. Heterotrophic prokaryotes can perform three major functions when processing organic matter: production of new bacterial biomass (bacterial secondary production), respiration of organic carbon to inorganic carbon (bacterial respiration), or utilization of organic carbon for maintenance (*Del Giorgio and Cole, 1998*). In this work, for the same quantity of carbon consumed, the growth of the communities was different according to the dissolved substances used. Thus, HP seemed to use more dissolved substances from H for growth while dissolved substances from O were more prone to be used for maintenance and/or bacterial respiration.

DOM bioavailability may be dependent on the relative quantity of carbon but also of other elements such as nitrogen and phosphorus (*Fenchel and Blackburn, 1979; Thingstad et al., 1997; Del Giorgio and Davies, 2003; Nieto-Cid et al., 2006*). Indeed, microorganisms regulate the catabolism of organic substrates according to their stoichiometric needs. In the present study, DIN and DON concentrations ranged between 0.3 - 18.8 μM and 5.4 - 6.3 μM , respectively. These values are in the range of average oceanic and coastal values given in Hansell and Carlson (*2002*) and Coclet et al. (*2019*). DIN concentration was initially higher at H and a significant consumption was recorded under the corresponding experimental

conditions. This result shows the presence of an excess of DIN in the pool of dissolved substances which allowed the strongest stimulation of bacterial growth. These observations are in agreement with experimental data, for example Seitzinger and Sanders (1999), demonstrating that the addition of dissolved substances enriched in inorganic nitrogen resulted in an increase of bacterial growth. Conversely, no difference in the initial concentration and consumption of DON was demonstrated in our experiments. DIN appears to be more bioavailable to microbial communities than DON. Microorganisms therefore seem to draw the nitrogen necessary for growth rather in its dissolved inorganic form than in its dissolved organic form.

DIP and DOP concentrations measured in this study ranged between 0.01 - 0.02 μM and 0.1 - 0.2 μM , respectively. These values are also in the range of average oceanic and coastal values given in Hansell and Carlson (2002) and Bogé et al. (2012). Phosphorus in its various forms currently has very low values and is known to be a limiting factor in DOM recycling processes in the Mediterranean Sea (Van Wambeke et al., 2002; Lucea et al., 2003; Pinhassi et al., 2006; Bogé et al., 2012). DIP concentration was initially low and similar between the two sites and no difference in consumption between the conditions could be detected during the incubation experiments. On the other hand, DOP concentration differed between the sites with an enrichment in H and a higher consumption by the microbial communities under the corresponding experimental conditions. In seawater, DOP is generally considered to be the main phosphorus reservoir in surface waters (De Madron et al., 2003). In such environments, DOP is essential to ensure DIP supply for planktonic cells when DIP concentrations become insufficient and/or to restore imbalanced N/P ratios caused by excess of nitrogen (Perry, 1972; Benitez-Nelson, 2000; Nausch and Nausch, 2004; Neddermann and Nausch, 2004; Labry et al., 2005). These organic phosphorus reserves generally come from dead plankton, phytoplankton secretions, rain water, riverside discharge, continental erosion or sediment resuspension (Guillaud and Romaña, 1991; Migon et al., 2001). The differences in concentrations between the two sites can therefore come from the variability of the sources and the hydrodynamic specificities of the Mediterranean basins in the area of study. In this study, the highest concentration of DOP recorded at H stimulated its consumption and bacterial growth. This is in agreement with numerous *in situ* or laboratory experiments which demonstrate that additions of DOP caused significant increases in bacterial production (Thingstad et al., 2005; Tanaka et al., 2009). DOP appears to be more bioavailable to microbial communities than DIP. Since inorganic phosphorus is a limiting factor in the Mediterranean Sea found at extremely low concentrations, heterotrophic prokaryotes may have adapted to

draw the phosphorus necessary for growth rather in its dissolved organic form rather than in its dissolved inorganic form, avoiding competitive exclusion by resources partitioning.

We thus showed that DIN and DOP were respectively an important source of nitrogen and phosphorus for the communities and that their concentration could influence DOM fate through the microbial loop. Hence, under equivalent DOC concentrations and consumption, both the elemental content of DOM and the availability of inorganic nutrients appear as key factors controlling DOM bioavailability for HP. Under the experimental conditions chosen, HP community originating from contrasted areas with dissolved substances sustaining largely different growth potential did not allow us to evidence any significant biological control on DOM fate.

IV.2.5.2. Insights into the influence of DOM molecular composition on its fate

Numerous studies showed that DOM quality is an important driver of DOM bioavailability (*Del Giorgio and Cole, 1998, Kowalczuk et al., 2013; Shen and Benner, 2020*). Since we already demonstrated above that P-containing compounds were important, more precise evaluation of the molecular diversity of DOM could help provide new insights on its control on DOM bioavailability for HP. As a first approach, we identified the main fluorescent components in the DOM pools and studied their dynamics during dilution experiments, a common approach in the literature (*e.g. Rochelle-Newall, 1999; Nelson et al., 2004; Retelletti Brogi et al., 2021*). In this study, the PARAFAC analysis of EEMs validated a four-component model of four fluorescent compounds: marine and terrigenous humic substances and two protein-like substances (tryptophan and tyrosin). Protein-like compounds, as well as their degradation products are believed to be a biodegradable fraction of DOM preferred by bacteria (*Lønborg et al., 2010*), their relative amount in the FDOM pool is an indication of the presence and proportion of labile dissolved organic carbon that can be readily used by the microbial communities (*Hudson et al., 2008; Fellman et al., 2009a, b; Hood et al., 2009*). Humic-like compounds are usually divided into terrestrial humic-like often associated with decomposed plant material and soil of terrigenous origin (*McKnight and Aiken, 1998*) and marine humic-like associated with complex and degraded DOM linked to autochthonous biological activity in the water column (*Nieto-Cid et al., 2005; Stedmon and Markager, 2005; Romera-Castillo et al., 2010*). It is now recognized that both terrestrial and marine humic-like substances can be directly released by phytoplankton (*Castillo et al., 2009; Bachi et al., 2013*). The enrichment of these three fluorescent components in the harbour indicate a higher percentage of FDOM in the

port with respect to the open area with the same DOC content. These observations are consistent with the hypothesis of a fresher DOM and a higher *in situ* DOM processing by HP in the harbour. Then, the higher consumption of these three fluorescent components under the conditions with dissolved substances from H, corresponding to higher net HP growth in our experiments, supports the hypothesis of an important contribution of DOM quality in its lability and fate. However, in the incubation experiments the fluorescence intensity of all components decreased with the dissolved substances from H, making it difficult to discriminate and to identify the compounds preferentially used for the HP growth.

The molecular characterization carried out by HRMS showed that the DOM from coastal sites was composed of a very wide variety of molecules present in small proportion. More than 69% of these molecules were predicted to be labile according to the MLB (*D'Andrilli et al., 2015*). In this study, these so-called labile molecules are largely divided into two groups: molecules composed of carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and phosphorus (CHNOP) and molecules composed of carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulfur (CHNOS). The CHNOP and CHNOS molecules alone represent all the labile molecules that we have identified in this study. However, in this study, microbial processing affected a low number of molecules (from < 1 to ~ 5 %). A large part of the molecules designated as labile according to the MLB was not consumed. This observation highlights the gap between prediction of molecular lability based on molecular formulae and the observed net consumption of compounds by natural marine communities. The MLB is not sufficient to explain these data obtained on two different areas, but which are part of the same ecosystem.

Then, CHNOP and CHNOS were present in greater quantity in the harbour and were significantly consumed in the conditions with the dissolved substances from H whereas no significant consumption of labile compound could be demonstrated under the conditions with the dissolved substances from O. Whether the consumption of CHNOP is in good agreement with the consumption of DOP mentioned above, CHNOP and CHNOS all contain nitrogen and the most consumed compounds in our experiments were composed of four N atoms. These observations suggest a key role of N-containing compounds for marine DOM fate in the Mediterranean coastal environments.

When considering molecular families of dissolved organic compounds, a significantly different molecular composition of the DOM between the two sites was observed. It corresponded to an enrichment in proteins, amino sugar and carbohydrates in the harbour while the DOM of the open site was preferentially made up of lignin. DOM composition of H underwent significant changes during incubation with consumption of the compounds that were enriched in this site.

Since the DOM pool of O did not present statistically significant overall change, these observations suggest that the presence of proteins, amino sugar and carbohydrate and their consumption by HPs contributed to the observed growth differences. However, it should be noted that under the conditions with dissolved substances from O, the H community significantly consumed some carbohydrates and amino sugars (as well as nitrates and nitrites). These differences may come from the 10% supply of dissolved substances from H available in this condition because it must be added at the same time as the community. However, the consumption of these compounds did not allow a significantly stronger growth than that measured with the community from O.

The consumption of labile compounds in the harbour water resulted in the significant production of various metabolites. Microorganisms converted nitrogen-containing amino sugars and protein compounds into more oxygenated and less hydrated (more unsaturated) structures. Interestingly, these produced compounds seem to correspond to those that were initially enriched in the DOM pool of the open site and that were significantly consumed when incubated with the HP community of the same site. Such molecules, predicted to be recalcitrant according to the MLB (*d'Andrilli et al., 2015*), appear to be processed in relatively short time scales by HP but do not support important growth. Thus, our results tend to illustrate the progressive consumption and transformation of the most labile organic compounds into more recalcitrant ones at the scale of a few weeks, demonstrating the dependence of HP on production or inputs of fresh DOM for their growth. This continuing microbial transformation could thus strongly contribute to the progressive accumulation of poorly labile DOM in Mediterranean surface waters, along with other processes proposed earlier (*Santinelli et al., 2010; Hansell, 2013; Dittmar et al., 2021*).

At the community scale, many studies have shown that if the supply of organic matter is low, a large fraction of this substrate will be catabolized and used primarily for maintenance energy requirements rather than for growth, with a resulting low growth efficiency (*Stouthamer and Bettenhausen, 1973; Russell and Cook, 1995*). Our experiment was conducted with rather high DOC concentrations. According to our results, we can hypothesize that the availability of certain molecular families, more than the overall availability of DOM, appears to determine HP growth abilities and the lability and fate of the overall DOM pool. Further experimental work would be needed to specifically disentangle or compare the respective influence of DOM composition and DIN availability.

IV.2.5.3. The dynamics of HP community structure is determined by the dissolved substances properties

During dilution experiments, alpha diversity decreased in all conditions and community structure was modified. We are aware that the dilution of HP performed in these marine cultures, often deeply alter community structure and functioning through bottle effect (*Cram et al., 2015*). The experimental conditions allowed the development of a similar dominant family in all conditions: the Alteromonadaceae. Members of Alteromonadaceae are known as opportunists having diverse genomic and metabolic potentials, commonly making them the most dominant group especially in conditions with a sufficient supply of labile organic material such as that found during phytoplankton bloom conditions (*Teeling et al., 2012; Buchan et al., 2014; Xu et al., 2022*). Alteromonadaceae are r-strategists that can quickly make use of available substrates (*Allers et al., 2007; McCarren et al., 2010; Pedler et al., 2014; Neumann et al., 2015*). The dilution carried out in the incubation experiments therefore favoured the development of these opportunistic species in all conditions, which explains the decrease in alpha diversity observed. Besides the massive development of Alteromonadaceae in all conditions, the microbial community reacted differently to the two pools of dissolved substances resulting in differences in community structure and composition between conditions.

Despite the common development of Alteromonadaceae, the initial HP communities responded differently toward the two pools of dissolved substances and to their differences in chemical composition of organic matter and nutrient concentration. These abiotic differences have led to differences in consumption and biomass production, but also to a differentiation of the community structure. Distinct dominating microbial groups responding to different substrates could be due to different microbial growth strategies or metabolic capacities (*Polz et al., 2006; Lauro et al., 2009*). The assimilable substances from H promoted the development of Gammaproteobacteria, especially Pseudomonadales and some specific Bacteroidota from the Flavobacteriaceae family. Members of the Bacteroidetes, particularly the Flavobacteriaceae families, are known to represent one of the most abundant groups of bacteria in coastal areas (*Sun et al., 2013; Korlević et al., 2015*). Bacteroidetes are also abundant during and after algal blooms (*Pinhassi et al., 2004*), showing a preference for the consumption of polymers rather than monomers (*Cottrell and Kirchman, 2000*). The Flavobacteria are particularly specialized in the degradation of proteins (*Fernández-Gómez et al., 2013*). Their enrichment in incubations with dissolved substances from H was therefore consistent with the consumption of protein

compounds. The dominance of the Bacteroidetes group is often associated with a high nutrient concentration and high bacterial production (*Kirchman, 2002*), which also corresponds to our observations. Gammaproteobacteria can be selected by high concentrations or intake rates of labile DOM (*Elifantz et al., 2007*). Gammaproteobacteria have many transporters allowing them to use a wide range of substrates (*Tang et al., 2012*). This group is known to contribute mainly to the assimilation of sugars which could explain the high consumption of amino sugar and carbohydrates in the conditions with dissolved substances from H.

Conversely, the low inorganic nutrient concentrations recorded in the water of O seem to have favored the maintenance of typical and initially predominant Alphaproteobacterial oligotrophs such as the SAR11 clade, known to thrive under less-rich conditions (*Mehrshad et al., 2018*). According to the low maximal abundance observed, this clade would have mainly used DOC to produce energy rather than for biomass production, which corresponds to the current knowledge for this clade (*Sun et al., 2011*). The assimilable substances from O also allowed the development of Rhodobacterales from the Rhodobacteraceae family, whose dominance in seawaters is often associated with the presence of more complex substrates requiring specific transporters and enzymes for their degradation (*Sun et al., 2011; Hernandez et al., 2021*). Their enrichment in the conditions with dissolved substances from O, suggest that compounds often considered recalcitrant for some bacterial strains (e.g., molecules classified in the family of lignins) are instead bioavailable for others.

Thus, in the dilution experiments, the properties of the dissolved substances therefore selected specific groups which do not use DOM with the same capacities. These specific groups do not have the same growth capacities and contribute to explain the different maximal abundance observed. Future work is needed to test the ability of HP community structure for predicting DOM fate in the ocean.

IV.2.6. Supplementary materials

The water samples were taken with a horizontal van Dorn type water sampler (Wilco, model Beta) previously cleaned with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) and thoroughly rinsed with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) in the laboratory. In the field, the sampler was rinsed with seawater from the site to be sampled before sampling.

Fifteen liters of seawater is stored in a twenty-liter bottle and four liter is stored in a fluorinated ethylene propylene (FEP) bottle. These containers are, in the laboratory, previously rinsed three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), sterilized with acid (10% v/v HCl, analytical

grade, Fisher Scientific) for 24 hours under stirring , rinsed again three times with Milli-Q water (18.2 MΩ, Millipore) then filled with acid (0.1% v/v HCl, Trace Metal Grade, Fluka). In the field, the FEP container and bottle were rinsed three times with seawater from the site to be sampled.

All the FEP bottles used followed the same conditioning protocol described above.

Dissolved substances and heterotrophic communities were isolated by filtration during the experiment. In order to avoid possible contamination of the carbon filtrates, the 0.2 μm polyestersulfone filters (Whatman, 47 mm) were previously washed with 100 mL of acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific), rinsed with 1L of Milli-Q water (18.2 MΩ, Millipore), then packaged with 150 mL of the sample to be filtered. The GF/F glass fiber filters were previously calcined (450°C, 6h), rinsed with 1L of Milli-Q water (18.2 MΩ, Millipore) then conditioned with 150 mL of the sample to be filtered.

The 24 mL glass tubes used for the DOC concentration, DOM fluorescence intensity analysis and DOM molecular characterization were previously rinsed three times with Milli-Q water (18.2 MΩ, Millipore), sterilized with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) for 24 hours, rinsed again three times with Milli-Q water (18.2 MΩ, Millipore) then calcined (450°C, 6 hours). At the time of sampling, they were rinsed three times with the sample before being filled.

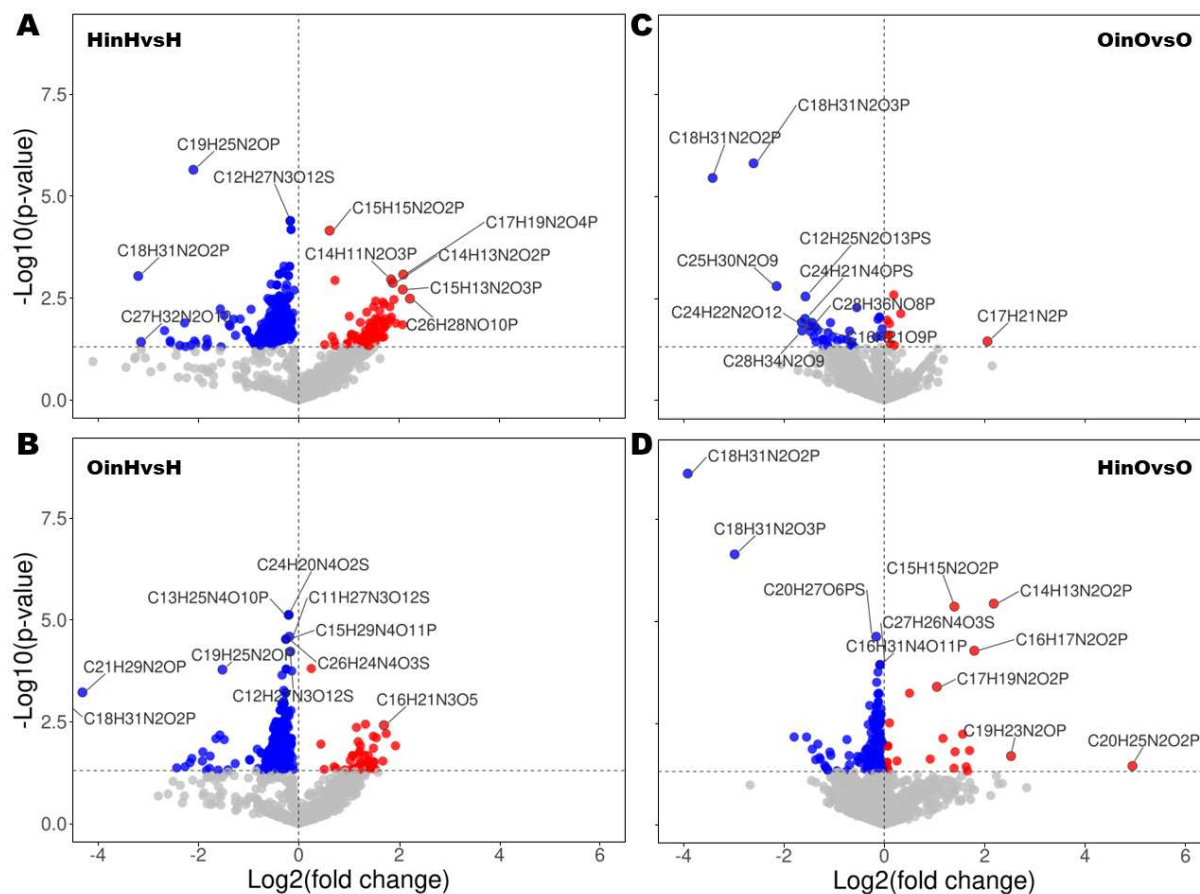


Figure S.I. IV.8: Volcano plot of the molecules identified by FTICRMS for each condition. The volcano plot shows the fold-change (x-axis) versus the significance (y-axis) of the identified molecules in (A) *HinH*, (B) *OinH*, (C) *OinO* and (D) *HinO* conditions. The significance and the fold-change are converted to $-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$ and $\text{Log}_2(\text{fold change})$, respectively. The vertical and horizontal dotted lines show the cut-off of fold-change = 0, and of p-value = 0.05, respectively.

Table S.I. IV.1: Average (\pm SD) temperature, salinity, chlorophyll a, dissolved organic carbon (DOC), nitrite, nitrate, phosphate, dissolved organic phosphate (DOP), dissolved organic nitrate (DON), total nitrogen and phosphate ratio, DOC and DON ratio, fluorescence intensity of component marine humic-like, terrestrial fulvic-like, tyrosine-like and tryptophan-like, percentage of labile and refractory molecules estimated using the molecular lability bound (MLB) and heterotrophic prokaryote abundance (HPA) assessed in the open area and harbour area.

	Open area	Harbour
Temperature ($^{\circ}$ C)	15.21	14.78
Salinity	39.9	36.9
Chlorophyll a (μ g/L)	0.21	1.25
DOC (μ M)	106.4 \pm 7.6	105.4 \pm 2.3
NO ₂ ⁻ (μ M)	0.01	0.27
NO ₃ ⁻ (μ M)	0.26	18.50
PO ₄ ³⁻ (μ M)	0.01	0.03
DOP (μ M)	0.14	0.25
DON (μ M)	6.36	5.48
N:P ratio	42.38	89.68
DOC:DON ratio	16.74	19.23
C1 _{MarHum-like} (R.U.)	0.022 \pm 0.002	0.063 \pm 0.001
C2 _{TerFul-like} (R.U.)	0.019 \pm 0.002	0.039 \pm 0.001
C3 _{Tyr-like} (R.U.)	0.025 \pm 0.000	0.042 \pm 0.001
C4 _{Trp-like} (R.U.)	0.021 \pm 0.001	0.052 \pm 0.000
MLB _L (%)	69.07 \pm 0.67	73.11 \pm 3.20
MLB _R (%)	48.27 \pm 0.70	42.51 \pm 3.29
HPA (cell.mL ⁻¹)	1.15 \pm 0.08 \times 10 ⁴	9.16 \pm 0.03 \times 10 ³

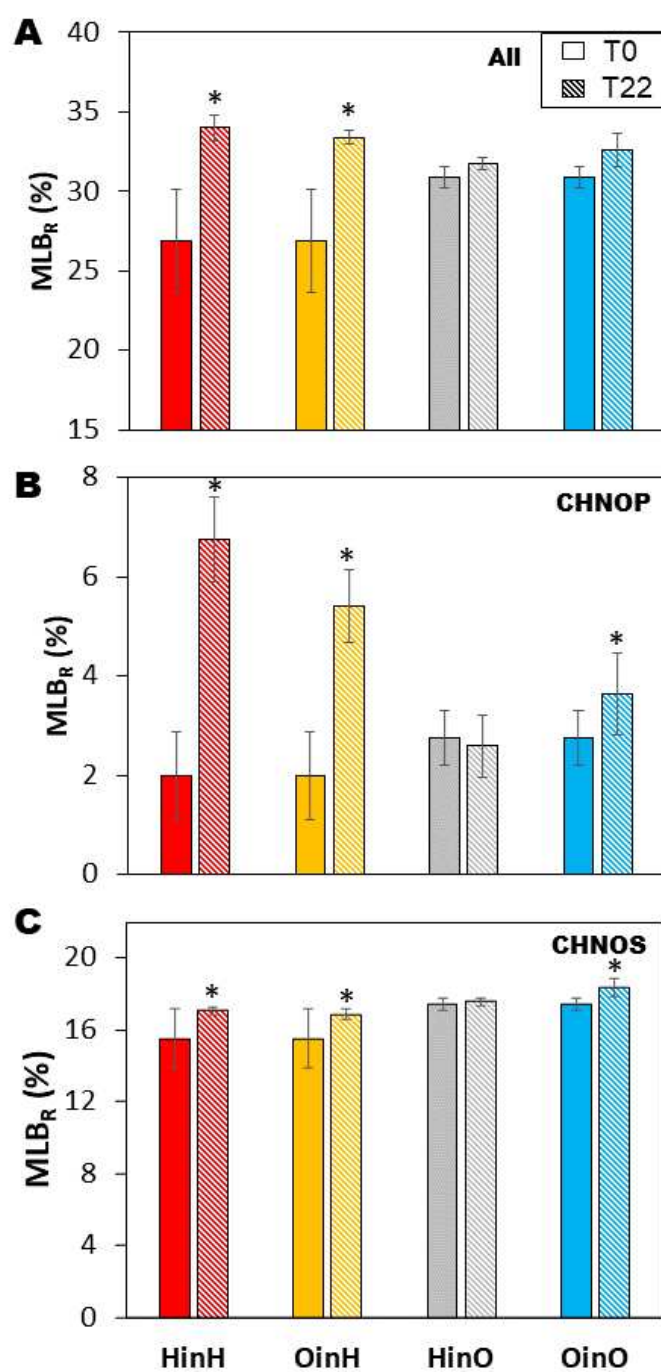


Figure S.I. IV.9: Percentage of refractory compounds of the dissolved organic matter in each condition at the initial (filled colors) and final (hatch) incubation time determined according to the molecular lability boundary (MLB) among (A) all elementary formulas combined, (B) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and phosphate (CHNOP) and (C) the heteroatomic molecular species containing carbon, hydrogen, nitrogen, oxygen and sulphate (CHNOS). Error bars denote standard deviation of triplicate analyses.

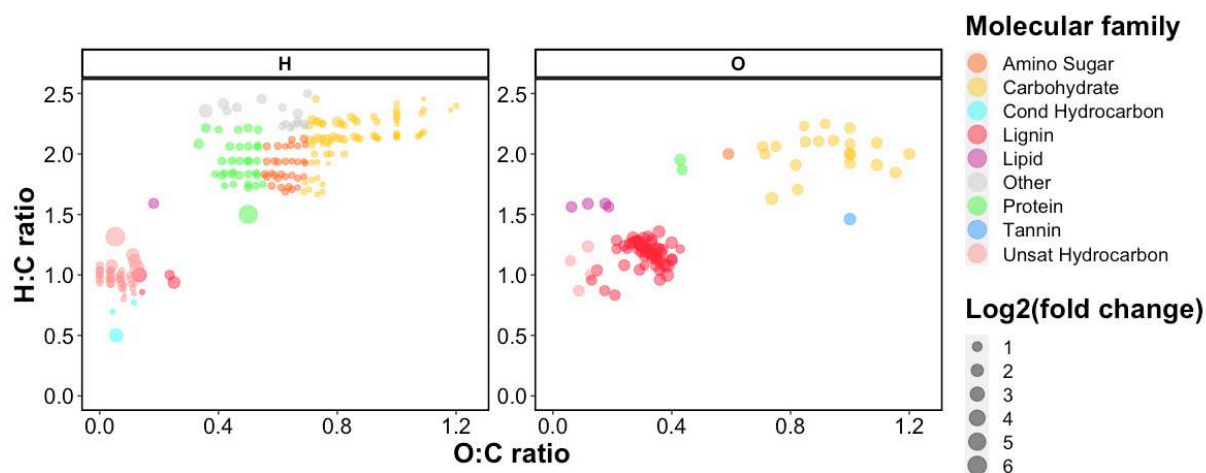


Figure S.I. IV.10: Van Krevelen diagram showing the molecules composing dissolved organic matter allowing to explain the initial differences between the two sites. The left panel represents the molecules preferentially present in Harbour area while the right panel represents the molecules preferentially present in the open area. The molecules are coloured according to their molecular family. The size of the dots is proportional to the variation factor of a molecule between the two sites.

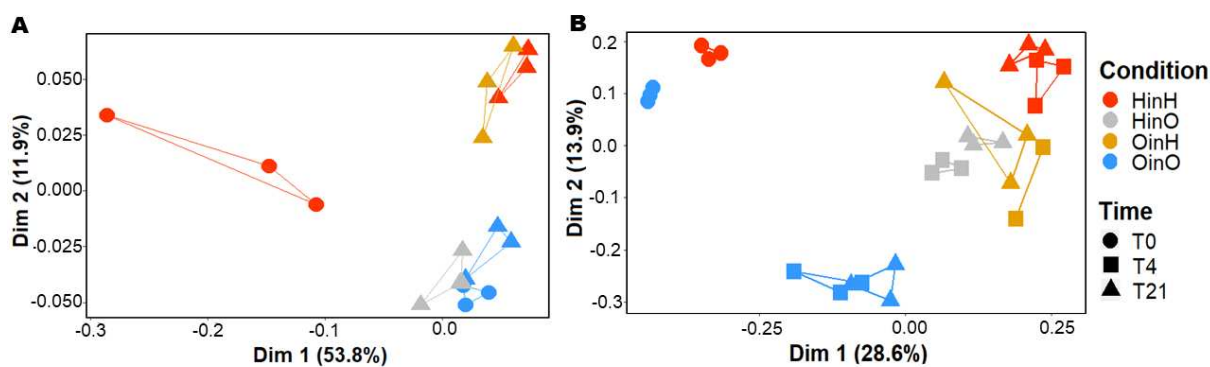


Figure S.I. IV.11: Principal coordinate analysis (PCoA) plots derived from (A) DOM molecular composition in each condition and at the beginning and the end of the incubation experiment and (B) from prokaryotic community composition in each condition and at the beginning, after 4 days of incubation and at the end of the incubation experiment.

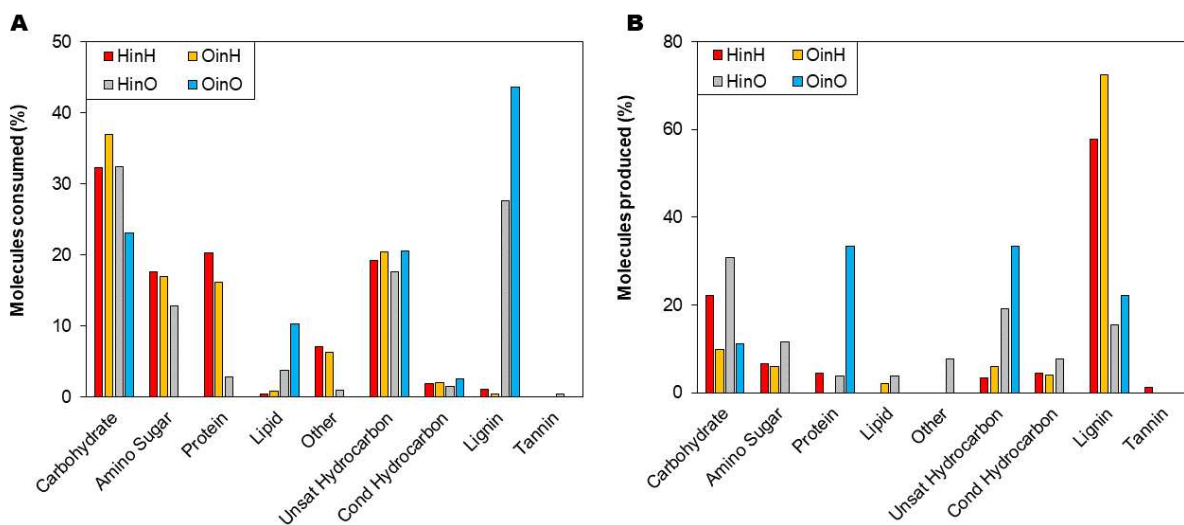


Figure S.I. IV.12: Fraction of molecules (A) significantly consumed and (B) significantly produced according to the different molecular groups for each experimental condition.

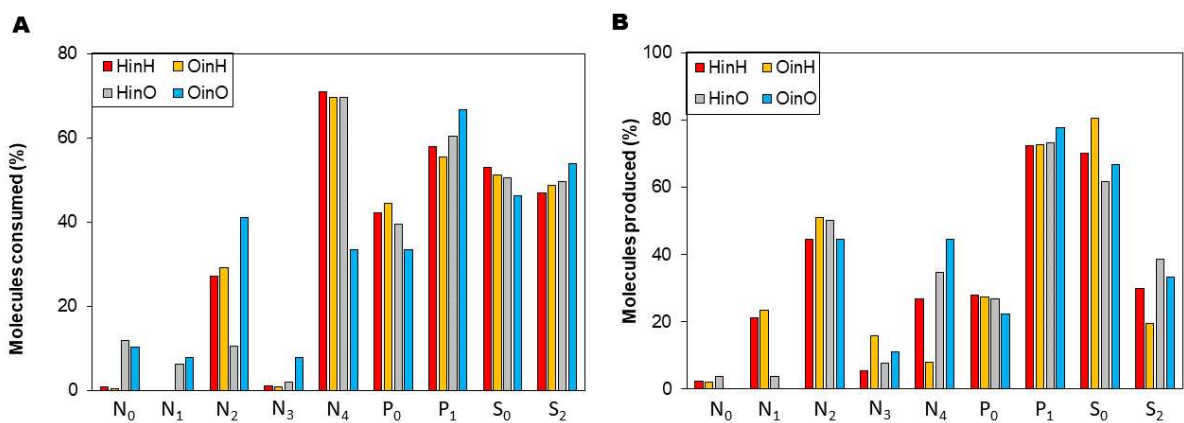


Figure S.I. IV.13: Fraction of molecules (A) significantly consumed and (B) significantly produced according to the number of nitrate (N), phosphor (P) and sulfur (S) in their molecular formula for each experimental condition.

CHAPITRE IV. HIÉRARCHISER LES FACTEURS RESPONSABLES DES VARIATIONS DE LABILITÉ DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE

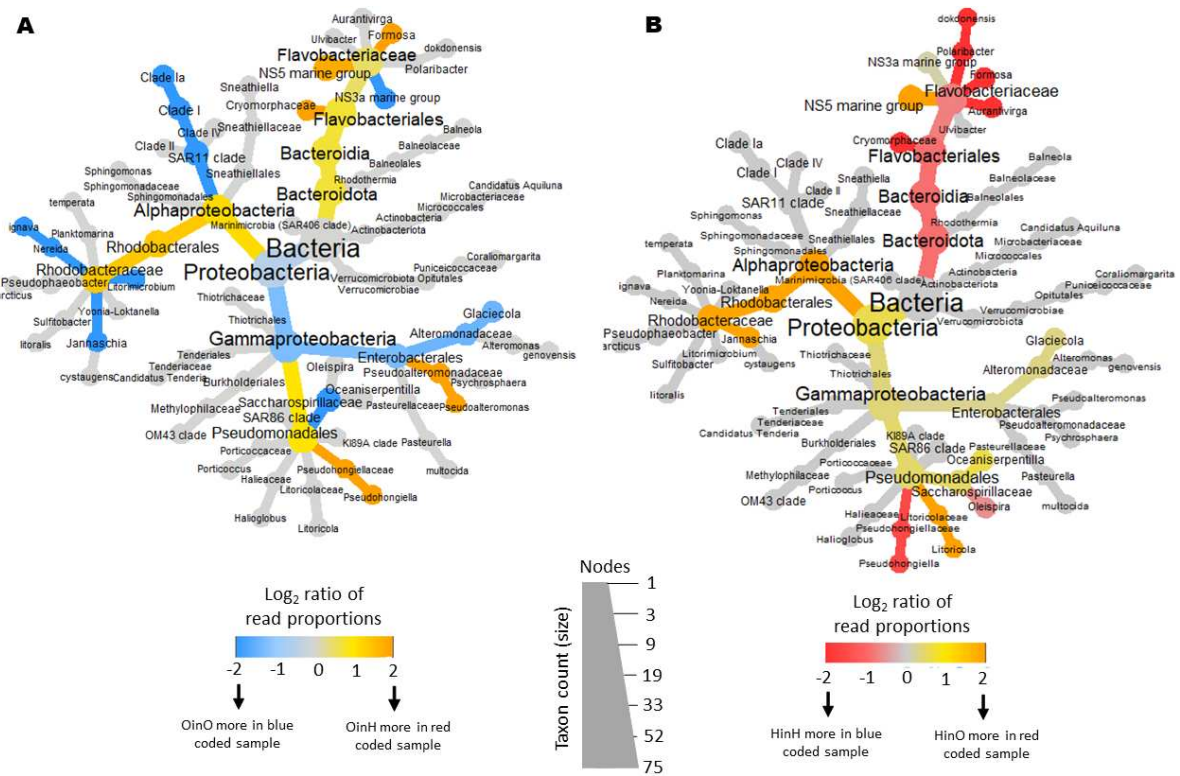


Figure S.I. IV.14: Heat tree illustrating the overall taxonomy of the heterotrophic procaryote community of (A) OinO condition (open area community in its own water) relative to that of OinH condition (open area community in harbour dissolved substances), (B) HinH condition (harbour community in its own water) relative to that of HinO condition (harbour community in open area dissolved substances). Color changes represent the difference in \log_2 ratio of median proportions of reads between conditions. The gray nodes are equally present in both conditions.

IV.3. Conclusion du chapitre

Ce chapitre avait comme objectif de caractériser et hiérarchiser les facteurs contrôlant la croissance des procaryotes hétérotrophes et le devenir de la DOM à travers la boucle microbienne. Les données de cette étude ont confirmé que la biodisponibilité de la DOM était liée aux propriétés des substances dissoutes. Dans un premier temps, cette étude a montré que la disponibilité des nutriments (azote et phosphore) était essentielle pour la croissance des procaryotes hétérotrophes. Les procaryotes hétérotrophes semblent puiser l'azote nécessaire à leur croissance plutôt sous sa forme inorganique tandis qu'ils puisent le phosphore plutôt sous sa forme organique. Ainsi, l'azote inorganique dissous et le phosphore organique dissous étaient respectivement une source importante d'azote et de phosphore pour les communautés et leur concentration pouvait influencer le devenir des DOM à travers la boucle microbienne.

Dans un second temps, l'étude de la composition moléculaire de la DOM couplée avec l'étude de la croissance bactérienne a permis d'étudier plus finement le rôle de la composition de la DOM sur sa biodisponibilité. Les données de cette étude ont montré que la biodisponibilité de la DOM dépendait également de l'enrichissement de certains composés qualifiés de labiles comme les protéines, les sucres aminés et les glucides. La disponibilité de ces familles moléculaires, plus que la labilité globale de la DOM, semblait déterminer les capacités de croissance des procaryotes hétérotrophes ainsi que le devenir de la DOM. Les résultats de cette étude ont également illustré la consommation et la transformation progressive des composés organiques les plus favorables à la croissance des procaryotes hétérotrophes en composés plus récalcitrants à l'échelle de quelques semaines, démontrant la dépendance du fonctionnement hétérotrophe de la base du réseau trophique planctonique à la production ou aux apports de DOM fraîche. Enfin, ces différences abiotiques ont conduit à des différences de consommation et de production de biomasse, mais également à une différenciation de la structure des communautés. En effet, les propriétés des substances dissoutes ont sélectionné des groupes spécifiques qui n'utilisent pas la DOM avec les mêmes capacités.

Par conséquent, la composition moléculaire de la DOM et la disponibilité en azote et en phosphore apparaissent comme des facteurs clés contrôlant le soutien de croissance des procaryotes hétérotrophes et le devenir de la DOM. A l'issue de cette étude il apparaissait nécessaire de comprendre les sources de ces substances dissoutes modifiées dans les milieux sous forte pression anthropique.

CHAPITRE V.

TRACER LES SOURCES DES FACTEURS CONTRÔLANT LE DEVENIR DE LA DOM

V.1. Avant-propos

Comme nous l'avons démontré précédemment, les eaux côtières présentent de fortes variations de quantité et de qualité de matière organique dissoute dans le temps et dans l'espace. Ces variations peuvent avoir une influence sur la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique. Dans les zones côtières, l'hétérogénéité des substances dissoutes est principalement due à la diversité de leurs sources. Parmi les sources potentielles de substances dissoutes, on retrouve par exemple les intrants terrestres, les apports par les rivières, les rejets d'eau souterraine, les activités anthropiques, la remise en suspension des sédiments et la production autochtone (*Laubier, 2005 ; Nicholls et al., 2007*). Comme la DOM est un mélange complexe de milliers de composés chimiques, elle peut être considérée comme étant composée de plusieurs pools avec une réactivité différente déterminée par son origine (*Lønborg et Álvarez-Salgado 2012 ; Wilson et Xenopoulos 2009*). En effet, par exemple, les sources allochtones et autochtones de DOM diffèrent en stœchiométrie, la matière organique dérivée du sol fournie par les rivières ou le ruissellement est généralement plus riche en carbone avec des rapports C:N plus élevés (*Mattson et al., 2005*) par rapport à la DOM produite par le phytoplancton (*Lønborg et al., 2009*). Les différences fondamentales dans la composition biochimique des plantes terrestres et aquatiques ainsi que dans le traitement microbien de la matière organique dans les sols par rapport à l'eau sont la principale raison de cette divergence. De plus, la diversité des systèmes côtiers, incluant des baies fermées ou ouvertes, des estuaires, des archipels et des lagons, correspond à une diversité de temps de résidence de l'eau sur ces sites, ce qui peut également influencer le devenir de la DOM. Ces modifications liées aux sources et aux temps de séjour de l'eau nécessitent une attention particulière pour comprendre quelle est la source la plus importante dans un milieu, quelles modifications sur les substances

dissoutes cela entraîne et quelle influence cela peut avoir sur le traitement de la DOM par la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique.

Ce chapitre s'articule autour de deux études différentes sous forme d'articles scientifiques (en préparation). L'objectif de ce chapitre est d'évaluer le rôle de la colonne sédimentaire comme source de DOM ou de substances dissoutes affectant le devenir de la DOM. La première étude (article IV) est consacrée au diagnostic de l'influence de la colonne sédimentaire sur la qualité des eaux et le fonctionnement de la base du réseau trophique pélagique dans un écosystème donné, via l'utilisation de radioéléments couplée à des méthodes déjà utilisées dans les chapitres présentés précédemment. La seconde étude (article V) consiste en une approche expérimentale permettant d'investiguer de façon plus précise les changements que pouvait causer une remise en suspension de sédiments sur les substances dissoutes et sur le fonctionnement de la base hétérotrophe du réseau trophique.

V.2. Influence of the sedimentary column on DOM properties and the functioning of the heterotrophic base of the planktonic food web

Clara Dignan^{1*}, Benjamin Misson¹, Véronique Lenoble¹, Nicole Garcia², Benjamin Oursel²,
Virginie Sanial¹

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

²*Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, Marseille, France*

* Corresponding author.

E-mail address: clara.dignan@univ-tln.fr

Article en préparation.

V.2.1. Abstract

Coastal areas receive many nutrients of various origins, a large part of which is deposited in the sediments. Sediments can be an important source of nutrient resources for the water column through different processes such as diffusion and resuspension of sediments. Detecting this source and its biogeochemical consequences represents a major scientific challenge. This work consisted in carrying out a diagnosis of the influence of the sedimentary column on the dissolved substances and on the functioning of the heterotrophic base of the planktonic trophic network in an urbanized bay (Lazaret bay, France, NW Mediterranean). For this, radioactive isotopes of radium were used as tracers of sedimentary inputs and the spatial variability of the chemical composition of surface waters was carried out. The highest radium concentrations were recorded along the coast, the lowest concentration corresponded to the point sampled in the area open to the sea. Radium concentrations were positively correlated with some fluorescent compounds in dissolved organic matter, dissolved inorganic phosphorus and dissolved organic nitrogen concentration. In parallel, the influence of dissolved substances modified by sedimentary inputs on the heterotrophic basis of the planktonic food web was evaluated by a laboratory experiment. Each pool of dissolved substances taken from the Lazaret Bay was isolated by filtration and then inoculated with a natural community of heterotrophic prokaryotes. Net growth was followed for 4 days. It was largely stimulated by the dissolved substances under strong sedimentary influence, the abundance reaching 34 times that of the maximum observable with the dissolved substances of the open area. In view of these results, we hypothesized that sediments are an important source of modified dissolved substances affecting the biogeochemical functioning of the bay. However, the influence of the sedimentary column does not explain the strongest growth, linked to dissolved substances in the harbour area. This result suggests that there are other sources of dissolved substances in the harbour area also affecting biogeochemical functioning at a more localized scale.

Keywords: sediment supply, radium, biogeochemistry, plankton, heterotrophic prokaryotes, net growth

V.2.2. Introduction

Coastal zones function as buffer zones for contaminants and nutrients entering a marine ecosystem from its watershed. A significant portion of these compounds are deposited in sediments before they can be used in the water column (*Percuoco et al., 2015*). However,

sediments can become an important source of nutrients and contaminants for the water column through different mechanisms such as resuspension and diffusion (Reddy *et al.*, 1996; Dadi *et al.*, 2017; Peter *et al.*, 2016). In the coastal zone, sediment resuspension caused by waves, currents or human activities is a common phenomenon that increases the flux of remobilized substances from the sediments. For several years, studies have shown that a transfer of chemical elements by underground way to the water column can also take place via a process of groundwater discharges much more diffuse and discontinuous than the processes mentioned above (Moore, 2010). All of these phenomena can have an influence on the chemical composition of the water and indirectly on the productivity of the system. The influence of the sedimentary column is difficult to trace *in situ*. The use of geochemical tracers, and in particular natural radioactive isotopes of radium (Ra) is a relevant approach because it provides an integrative approach to the influence of the sedimentary column. Ra is a radioelement naturally produced by radioactive decay of thorium present on mineral particles. It is thus enriched in the sedimentary compartment, where it accumulates in the interstitial water. Ra diffuses from the sediments to the water column, so it is a tracer of the contact of water masses with the sediment (Moore, 2010). The two isotopes ^{223}Ra and ^{224}Ra have short half-lives of 11.4 days and 3.66 days, respectively, allowing processes to be traced on time scales of days to weeks. If their concentrations or the radioactivity from Ra can be considered as markers of contact with sediments, the $^{223}\text{Ra}/^{224}\text{Ra}$ activity ratio constitutes a radiochronometer free from dilution effects and representing the time elapsed since contact with sediments (Moore, 2000; Rodellas *et al.*, 2023).

The objective of this study is initially to carry out a diagnosis of the influence of the sedimentary column on the dissolved substances and on the functioning of the heterotrophic base of the planktonic food web in a coastal zone. Coastal areas are also influenced by many inputs in addition to sediments such as direct inputs by human activities or freshwater inputs. Thus, this study also made it possible to compare the sedimentary influence with other potential sources of dissolved substances such as aquaculture, the harbour area and freshwater inputs, for example. For this, a one-off observation study coupled with an experimental approach was carried out on a site particularly subject to the influence of sediments. The spatial variability of the chemical composition of surface waters was evaluated and the use of Ra as a tracer of sedimentary inputs made it possible to determine the influence of the sedimentary column on the dissolved fraction. In parallel, dissolved substances from different stations in the study area and under contrasting influences were isolated and exposed to a microbial community for 4 days to assess the growth of heterotrophic prokaryotes and its control factors.

V.2.3. Material and methods

V.2.3.1. Study area and sample collection

Toulon bay is a semi-enclosed Mediterranean bay under the influence of significant past and present anthropogenic activities (largest French military harbour in the Mediterranean, marinas, ferries, etc.). Studies have shown contamination of water but also sediments with organic (*Guigue et al., 2017; Pougnet et al., 2014; Wafo et al., 2016*) and inorganic (*Tessier et al., 2011*) chemical elements as well as in microbiological contaminants (*Arnal et al., 2001*). The low influx of fresh water and the low amplitude of the tides limit the renewal of the waters, thus favoring the accumulation of contaminants. Lazaret bay (43.08466N, 5.90519E), to the south-west of the Toulon bay, is a multi-contaminated zone which presents both shellfish farming activity, harbour activities with an area nautical repairs, urban discharges and many tourist activities. It therefore brings together many potential sources of allochthonous organic inputs that can promote the heterotrophic base of the planktonic food web. It faces a recurrent problem of insufficient water quality with regard to the required sanitary requirements, which has been correlated with that of the sediments (*Arnal et al., 2001*).

A sampling campaign was carried out on May 3, 2022 at 12 stations covering the entire Lazaret Bay (*Figure V.1*). A sample was taken in the harbour area (station 1). Four samples were taken along the coast (stations 2, 3, 4 and 5), three to the north of Lazaret Bay (stations 6, 10 and 13) and three in the direct vicinity of aquaculture facilities (mussel farming, stations 16, 18 and 19). Finally, sampling was carried out outside the Lazaret Bay, in the large of Toulon bay, which is more open to the sea (PT20). This last station will be considered as a reference, because under very low anthropic and sedimentary influence.

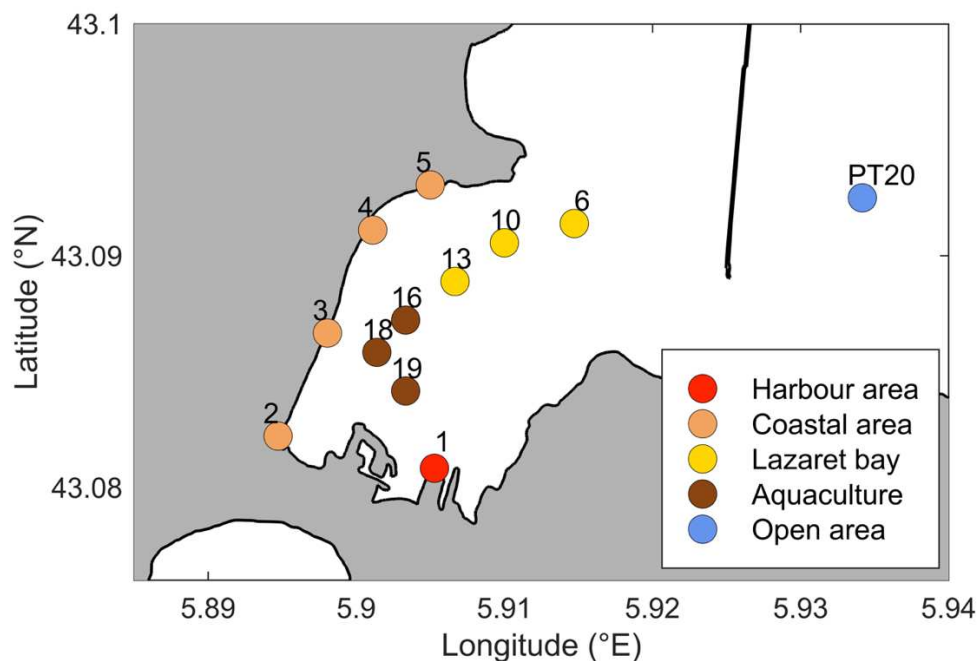


Figure V.1: Mapping of the study site and sampling stations

Before any manipulation, all the material used in this study has been previously conditioned, the conditioning protocols are available in the supplementary material. For each sampling station, 1L of surface seawater was sampled using a Van-Dorn bottle. In order to characterize the chemical composition of the surface waters of Lazaret Bay, the seawater sampled was filtered directly on site. To assess the amount of dissolved organic carbon (DOC), 24 mL subsamples were filtered through 0.2 μm polyestersulfone (PES, 33 mm) syringe filters, collected in preconditioned, acidified glass tubes. (10% v/v HCl, Analytical Grade, Fisher Scientific) and stored at 4°C. Following the same filtration protocol as for the DOC measurement, 24 mL of filtered water was stored in preconditioned glass tubes at 4 °C for further evaluation of the fluorescent DOM (FDOM) fraction. For nutrient concentration measurements (Dissolved Organic Nitrogen (DON), Dissolved Organic Phosphorus (DOP), Dissolved Inorganic Nitrogen (DIN), Dissolved Inorganic Phosphorus (DIP)), subsamples (50 mL) were filtered through syringe filters in polyestersulfone (PES, 33 mm) of 0.2 μm , collected in centrifuge tubes (Falcon) and stored at -20° C. In order to carry out an incubation experiment in the laboratory, surface water from each station was also stored in a 2L FEP and kept in a cooler until returned to the laboratory. In parallel, to assess the influence of the sedimentary column on surface waters, the spatial distributions of ^{223}Ra and ^{224}Ra were studied. For this, 60 to 100 L of surface water were sampled using a pump on each site and then immediately filtered through acrylic fiber impregnated with KMnO_4 to fix and preconcentrate

the different Ra isotopes. The filtration rate is set at 0.5 L/min to ensure 100% uptake (*Moore, 2008*). The fibers are then rinsed three times with MilliQ water to remove the retained salt. Rinsing is important because salt can interfere with radon emanation from the fiber during analysis (*Sun and Torgersen, 1998*).

V.2.3.2. Laboratory incubation experiments

The experiments consisted of isolating the dissolved fraction from each sampling point to expose it to a natural microbial community sampled from the PT20 station. The growth of heterotrophic prokaryotes (HP) as well as the consumption of dissolved substances will be used as a proxy to investigate the functional trophic and biogeochemical responses. For this, 112.5 mL of sterile seawater ($< 0.2 \mu\text{m}$, PES filter, Whatman, 47 mm) containing the dissolved substances from each sampling station were inoculated with 12.5 mL of seawater containing the community of heterotrophic prokaryote (HP) of PT20 station ($< 0.7 \mu\text{m}$, GF/F filter, Whatman, 47 mm) in a 150 mL FEP bottle. Each condition was performed in triplicate. All the bottles were then incubated at the average of the temperatures recorded *in situ* at the different stations (15°C.), in the dark (to avoid the phytoplankton production of fresh dissolved organic matter) for 4 days.

To follow HP growth, subsamples (1 mL) were taken immediately after the inoculum (T0) and then every day until the end of the incubation, fixed with glutaraldehyde (final concentration of 0.25%) and stored at -80°C prior to enumeration by flow cytometry. To monitor the concentration of nutrients (DOC, DON, DOP, DIN, DIP) as well as the composition of the FDOM, subsamples were taken at T0 and at the end of the incubation (Tf). The 150 mL bottles were opened and mixed before each sub-sampling which was carried out taking the necessary precautions to avoid any contamination by ambient microbes.

V.2.3.3. Chemical analysis

DOC concentrations were determined by high temperature catalytic oxidation using a Shimadzu TOC-VCSH carbon analyzer with an accuracy of 0.1 mgC.L^{-1} . The DOC analyses have been validated by comparison with the consensus reference material DOC (SUPER-05) (*Hansell, 2005*).

Inorganic nutrients (DIN, DIP) were measured by colorimetric methods by automated Technicon Autoanalyse III (*Tréguer and Le Corre, 1975*). The concentrations of total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) were determined using a wet oxidation technique (*Raimbault*

et al., 1999). DON and DOP concentrations were deduced by subtracting DIN concentrations from total nitrogen concentration and phosphate concentration from total phosphorus concentration, respectively.

The DOM quality was evaluated by characterization of the fluorescent fraction of the DOM. The three-dimensional excitation-emission (EEM) matrices of each subsample were recorded using a Fluoromax+ spectrofluorimeter (Horiba) using a 1 x 1 cm quartz cell. EEMs are used to distinguish fluorescence signals due to various groups of chromophores. The excitation wavelength varied between 220 and 450 nm in 5 nm increments, while the emission was measured between 220 and 600 nm. Using the drEEM toolkit (*Murphy et al.*, 2013), the EEMs were corrected from the EEM of Milli-Q water measured under the same conditions. EEMs were developed to suppress and interpolate Rayleigh and Raman scattering peaks. EEMs were normalized to the Raman signal of water, dividing the fluorescence by the integrated Raman band of Milli-Q water ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 371\text{--}428 \text{ nm}$), measured on the same day of the analysis. Thus, fluorescence intensity is expressed in water-equivalent Raman units (R.U.) (*Lawaetz and Stedmon*, 2009). The PARAFAC analysis was performed in MATLAB R2018a (Mathworks, Natick, MA) using two to seven component models with non-negativity constraints. The final four-component model was chosen for each experiment based on residual analysis and visual inspection (*Stedmon and Bro*, 2008). In this work, the study of the fluorescent fraction of the DOM and the PARAFAC analysis of the EEM validated a model of four fluorescent compounds: marine humic substances (peak M) and terrigenous (peak C) and two protein substances, the tryptophan (peak T) and tyrosine (peak B) (*Coble*, 1996).

After preconcentrating the radium on acrylic fibers impregnated with potassium permanganate (*Moore and Reid*, 1973), the concentrations of ^{223}Ra and ^{224}Ra were determined using a Radium Delayed Coincidence Counter (RaDeCC) (*Moore*, 2008). RaDeCC makes it possible to determine the activities of the ^{223}Ra and ^{224}Ra isotopes by analyzing their descendants, radon and polonium. This type of detector is particularly sensitive and makes it possible to analyze very low levels of radioactivity because the background noise associated with the measurement is very low.

V.2.3.4. Heterotrophic prokaryotes abundances (HPA)

After thawing, the samples were labeled with SYBR Green (final concentration 1X) for 15 minutes in the dark and the HPs were counted with an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). Fifty microliters were analyzed at a flow rate of $35 \mu\text{L}\cdot\text{mn}^{-1}$. Non-fluorescent

polystyrene microspheres (Flow Cytometry Size Calibration Kit, Thermo Fisher Scientific) were used as the size standard. The particles considered as HP were smaller than 2.0 μm , exhibited low complexity (low SSC), emitted significant green fluorescence and very weak red fluorescence (*Grégori et al., 2001*). Data was acquired using BD Accuri CFlow Plus software and HPA expressed in cells per milliliter (cell.mL^{-1}).

V.2.3.5. Statistical analyses

Correlations between physicochemical parameters and maximum abundance of heterotrophic prokaryotes in incubation experiments were assessed by Spearman correlation tests. All statistical analyzes and heatmap visualizations were performed using RStudio 2022.7.0.548 software (RStudio Team, 2022) in R 4.2.0 environment and *Hmisc* and *corrplot* packages.

V.2.4. Results & discussion

Dissolved substances from different areas of Lazaret Bay were isolated and exposed to a reference microbial community for 4 days. During the 4 days of incubation, a clear and rapid growth of opportunistic HP was observed in all conditions (*Figure V.2*). The use of dissolved substances from the harbour area of Lazaret Bay (station 1) resulted in the greatest increase in the abundance of heterotrophic prokaryotes (HPA). The HPA was up to 34 times higher than with the dissolved substances from the reference site (PT20). Dissolved substances from along the coast (stations 2, 3, 4, 5), around aquaculture areas (stations 16, 18, 19) and north of Lazaret Bay (stations 6, 10, 13), also resulted in stimulation of bacterial growth on average 15 times greater than that with the dissolved substances of the reference site (PT20). All the incubation experiments were carried out from the same community and at the same temperature, so only the differences in the properties of the dissolved substances can explain the differences in growth observed. These results demonstrate that the spatial heterogeneity of dissolved substances controls the potential of the heterotrophic base of the planktonic food web. Bacterial growth has been shown to be primarily dependent on the intrinsic molecular properties of DOM (*Del Giorgio and Cole, 1998; Kowalczyk et al., 2013; Carlson and Hansell, 2015; Dittmar, 2015; Shen and Benner, 2020*) and organic and inorganic nutrient concentrations (*Thingstad et al., 1997; Del Giorgio and Davies, 2003; Nieto-Cid et al., 2006*). Dissolved substances have properties inherited from their local environment. An environment gives its dissolved substances, through specific inputs and mechanisms, particular characteristics responsible for its unique reactivity (*Hansell and Carlson, 2001; Kim et al., 2003*). In coastal areas, among the

many potential inputs of dissolved substances, sediments can be an important source of various chemical compounds for the water column and can therefore exert a real influence on coastal ecosystems as well as on biogeochemical cycles (*Garcia-Solsona et al., 2010*).

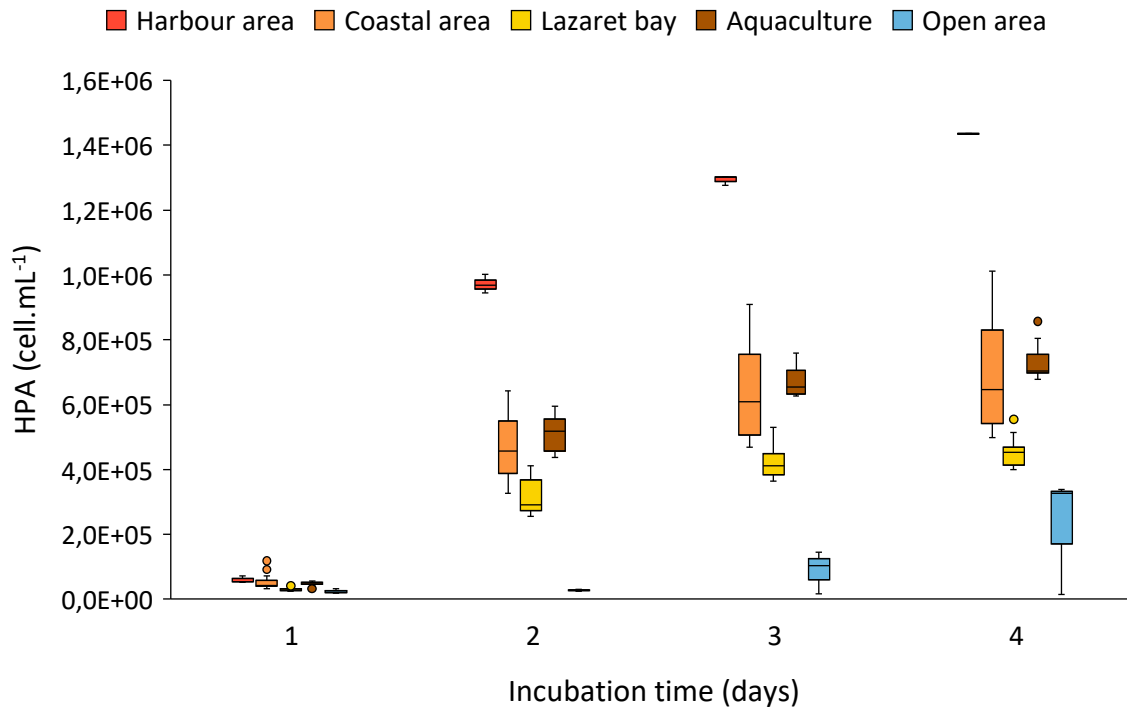


Figure V.2: variation in the heterotrophic prokaryotes abundances (HPA) during the incubation experiment. The conditions have been grouped according to the areas where the dissolved substances have been sampled: in the harbour area in red, near the coast in orange, in the north of Lazaret Bay in yellow, near aquaculture in brown and in the open area of Toulon Bay in blue. On the boxplots, the boxes represent the first (Q1) and third (Q3) quartiles, the band inside the boxes represents the median values. Whiskers represent minimum and maximum values while closed circles represent outliers.

The maximum HPAs obtained in each condition were found to be positively correlated with the concentration of the two radium isotopes ²²³Ra and ²²⁴Ra (*Figure V.3*). The natural radioactive isotopes of Ra are tracers of contact between water masses and sediment (*Moore, 2010*). A high concentration of these elements results in a strong influence of the sedimentary column. The positive correlation observed between the maximum HPAs and the concentrations of ²²³Ra and

^{224}Ra , suggests that the stimulation of bacterial growth can be directly or indirectly linked to sedimentary inputs.

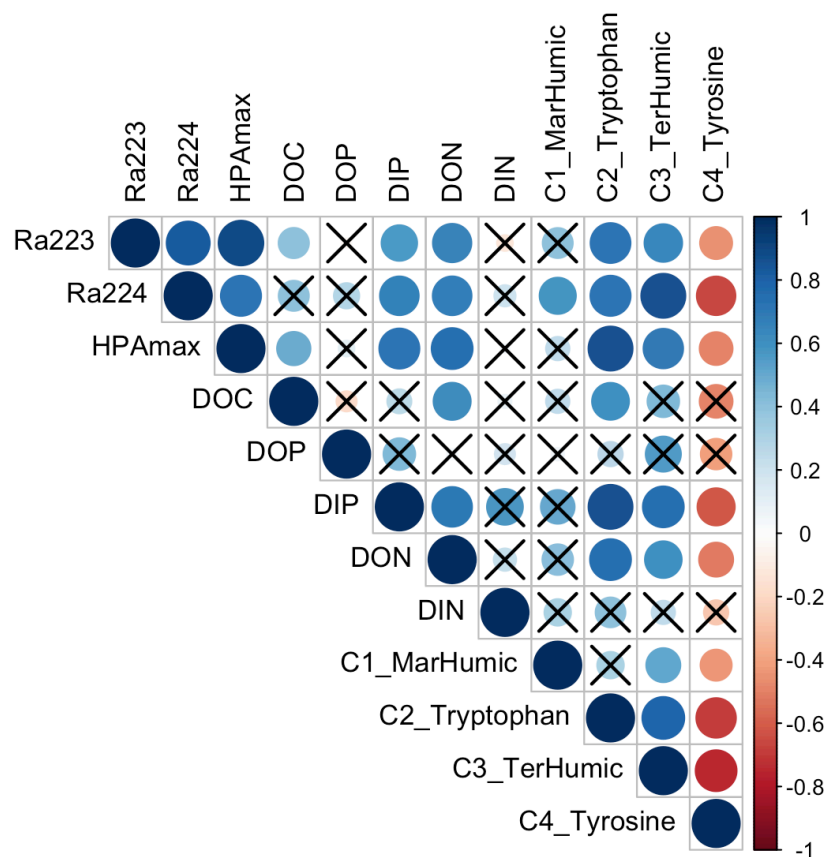


Figure V.3: heatmap of the correlation intensity between the physico-chemical parameters studied and the maximum density of heterotrophic prokaryotes during incubation experiments. The correlations were calculated from 39 values corresponding to 13 tripled experimental conditions. The color scale corresponds to Spearman's correlation coefficients. The absence of a cross corresponds to a correlation with a p -value < 0.05 .

However, sediments are not the only source of nutrient resources supporting microbial growth. The highest concentrations of ^{224}Ra and ^{223}Ra were measured in samples taken along the coast of Lazaret Bay (on average 39.56 ± 6.15 and 2.14 ± 0.05 dpm/100L respectively; *Table V.1*). These concentrations then decrease in samples taken around aquaculture areas (12.51 ± 1.07 and 1.10 ± 0.03 dpm/100L, respectively), then in those taken north of Lazaret Bay (9.33 ± 1.09 and 0.68 ± 0.04 dpm/100L). The points to the north of Lazaret Bay therefore seem to be under less influence from the sediments than the southern part of the Lazaret Bay. The harbour area is characterized by concentrations close to those recorded around the aquaculture areas (17.2 ± 0.7 and 1.30 ± 0.02 dpm/100L). The sediment influence on the surface waters of the

harbour area is therefore less significant than along the coast of Lazaret Bay. However, the dissolved substances from this area are the source of the strongest growth recorded. This observation suggests that sediment inputs are not the only sources of dissolved substances bioavailable to heterotrophic prokaryotic communities in the bay.

Table V.1: Activities of radium isotopes ^{224}Ra ($T_{1/2} = 3.66$ days) and ^{223}Ra ($T_{1/2} = 11.4$ days) measured in Lazaret Bay. The activities as well as the errors are expressed in disintegrations per minute and per 100 L of sea water (dpm/100L)

	Station	^{224}Ra (dpm/100L)	Err ^{224}Ra	^{223}Ra (dpm/100L)	Err ^{223}Ra	$^{224}\text{Ra}/^{223}\text{Ra}$	Err $^{224}\text{Ra}/^{223}\text{Ra}$
Harbor	1	17,16	0,70	1,27	0,02	13,5	0,6
Coastal area	2	99,18	3,71	5,49	0,01	18,1	0,7
Coastal area	3	27,32	1,34	1,69	0,02	16,2	0,8
Coastal area	4	12,98	0,46	0,63	0,01	20,7	0,8
Coastal area	5	18,75	0,64	0,74	0,01	25,2	0,9
Lazaret Bay	6	6,48	0,22	0,44	0,01	14,6	0,6
Lazaret Bay	10	12,35	0,48	1,01	0,01	12,2	0,5
Lazaret Bay	13	9,15	0,39	0,59	0,02	15,4	0,8
Aquaculture	16	8,66	0,28	0,79	0,02	10,9	0,4
Aquaculture	18	15,08	0,41	1,39	0,01	10,8	0,3
Aquaculture	19	13,79	0,38	1,10	0,01	12,5	0,4
Aquaculture (2021)	16	8,94	0,14	0,52	0,13	17,2	0,3
Open area (2021)	PT20	Below Detection Limit		0,02	0,01	-	-

The sediment inputs recorded in the Lazaret Bay have led to chemical modifications that may explain the growth stimulation of heterotrophic prokaryotes in incubation experiments. Indeed, the concentrations of ^{223}Ra and ^{224}Ra are also positively correlated with some chemical parameters measured such as DOC, DIP and DON as well as the fluorescent compounds C2_{Tryptophan-like}, C3_{TerrestrialHumic-like}. The influence of the sedimentary column therefore results in an enrichment of DIP, DON and DOC as well as a modification of the composition of the fluorescent fraction of DOM. Other studies have also found that DOC increases during resuspension of estuarine sediments primarily due to desorption of mineral-bound organic carbon (*Komada and Reimers, 2001; Guigue et al., 2017*). Some studies have also shown that the resuspension of sediments leads to nutrient fluxes towards the water column (*Fanning et al., 1982; Koschinsky et al., 2001; Qin et al., 2004*) and can modify DOM quality (*Harfmann et al., 2021*). Chemical compounds can be present in high concentrations in sediments, for natural reasons (interaction of water with rocks and soils, presence of vegetation and microorganisms) or anthropogenic (contamination linked to human pressure, wastewater discharges, mining waste, agriculture and land use) (*Valiela et al., 1990; Hwang et al., 2005; Beck et al., 2009*). In addition, the mineralization of organic matter in the sediments occurs at a slower rate compared to the oxygenated water column but can modify DOM quality (*Aller, 1994*). Consequently, diffusion from sediments or resuspension can lead to a significant input of

chemical compounds into the water column, modify the properties of dissolved substances and impact the heterotrophic base of the planktonic food web. If these correlations suggest the combined influence of various substances, the study of their consumption can help to perceive their respective influences.

The consumption of chemical compounds positively correlated with maximum HPA and radium concentrations was studied during incubation experiments. To do this, the concentrations (*Figure V.4*) or the fluorescence intensities (*Figure V.5*) of these elements were compared between the initial and final time of the incubation. The results obtained do not reveal a clear trend to explain the differences in growth observed between the conditions with dissolved substances in Lazaret Bay and those in the open area. Indeed, the data does not show any clear general trend but rather variations in consumption very specific to each condition, despite the differences in sometimes similar growth. Overall, Harbour, Lazaret Bay and Coastal area conditions showed DOC consumption while no consumption was detected in the Aquaculture and Open area conditions. Coastal area and Harbour conditions were the only ones that showed DON and DOP consumption. Many studies have shown that the DOM bioavailability is dependent on the relative amount of carbon and other elements such as nitrogen and phosphorus (*Fenchel and Blackburn, 1979; Thingstad et al., 1997; Del Giorgio and Davies, 2003; Nieto-Cid et al., 2006*). These results suggest a difference in DOM bioavailability between the pools studied but are not representative of the differences in growth observed. Indeed, none of these measured parameters can explain the differences in growth between Aquaculture and Open area conditions.

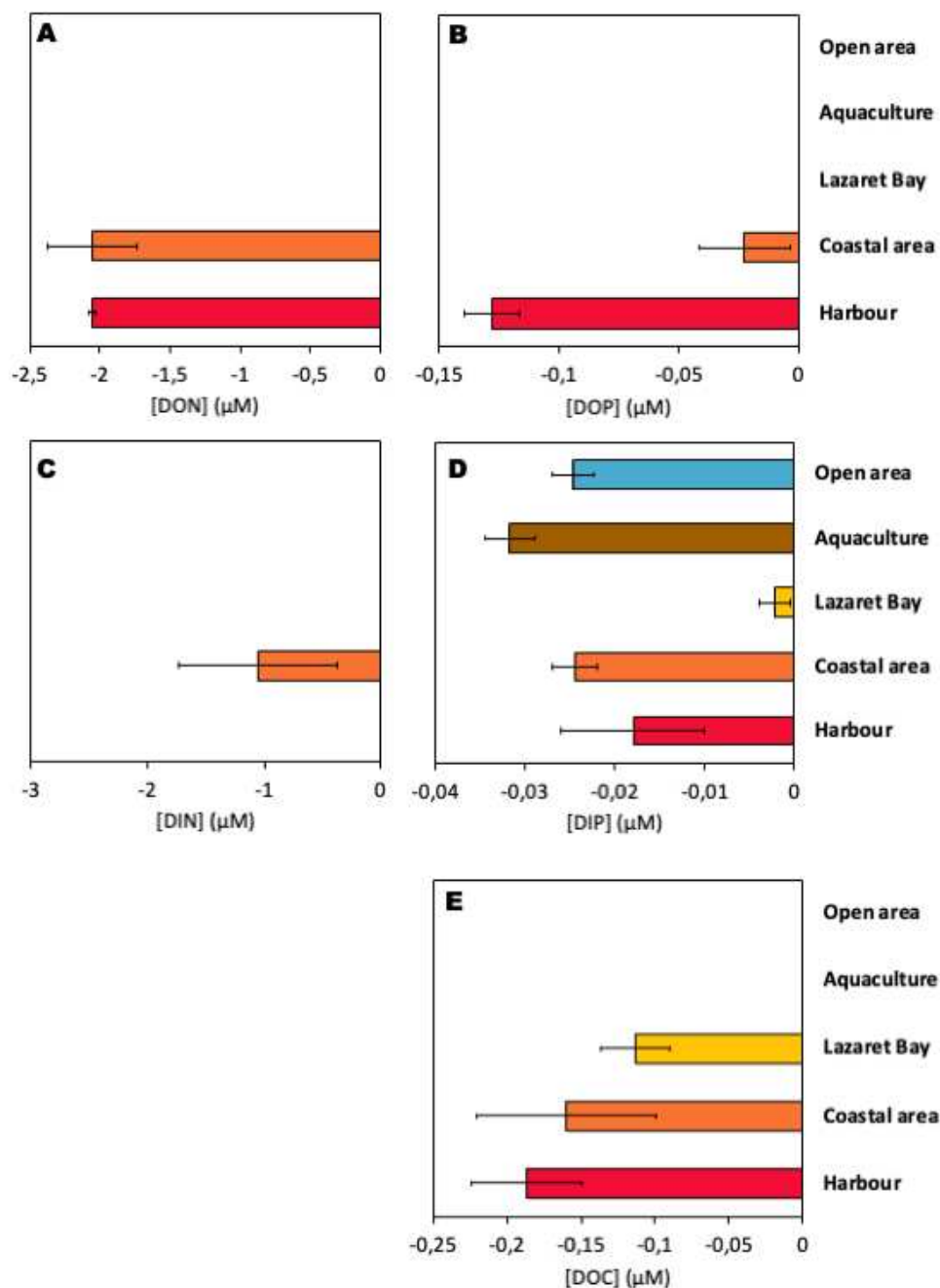


Figure.V.4 : Differences in DON (A), DOP (B), DIN (C), DIP (D) and DOC (E) concentrations between the final and initial time of the incubation experiment for each sampling area. The absence of a bar means that no consumption has been detected.

The study of the FDOM composition revealed obvious differences in the consumption of fluorescent compounds between the conditions with dissolved substances from Lazaret Bay and those from the harbour area (Figure V.5). Fluorescence intensities of the C₂Tryptophan-like compound decreased under all conditions. However, this decrease was up to 4 times greater in the condition with dissolved substances from the harbour area. The C₃TerrestrialHumic-like compound showed no variation in intensity during the incubation experiment for all the

conditions except for Harbour condition whose fluorescence intensity strongly decreased. Tryptophan-like compounds, as well as their degradation products, have been shown to be a biodegradable fraction of DOM preferred by bacteria (*Lønborg et al., 2010*). Terrestrial humic-like compounds are often associated with decomposed plant material and are generally defined as bioavailable to communities (*McKnight and Aiken, 1998*). The higher consumption of Terrestrial Humic-like and Tryptophan-like compounds in Harbour condition corresponded to a higher net HP growth in the experiments. These results support the hypothesis of a difference in DOM quality contributing to the potential growth support of the heterotrophic base of the planktonic food web. This quality difference does not seem to be directly related to the N or P content of the DOM, but rather to a difference in molecular composition. Thus, the differences in growth could be due to a variability in nutrient availability dependent on the DOM molecular composition, which should be studied at higher resolution by mass spectrometry techniques. To conclude, this work has made it possible to highlight the importance of the sedimentary influence on the scale of the Lazaret Bay but also the presence of other sometimes locally strong influences (harbour activities) which result in chemical alterations and changes in the functioning of the heterotrophic base of the planktonic food web.

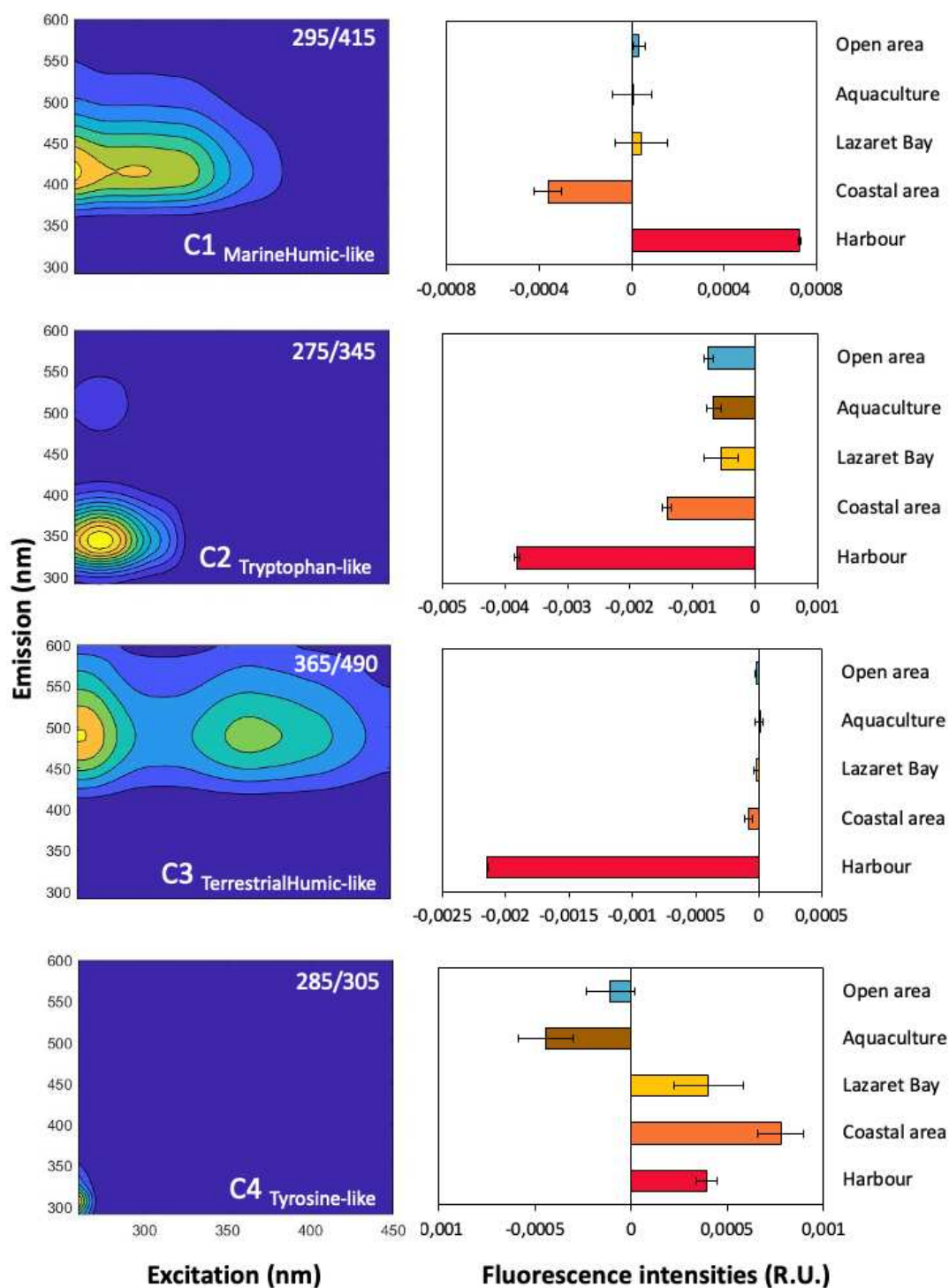


Figure V.5: (A) Fluorescence signatures of the four compounds identified by PARAFAC analysis: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 tyrosine-like. The contour plots of the C1 - C4 components are ordered by decreasing percentage explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing relative emission intensity. (B) Differences in fluorescence intensities between the final and initial time of incubation for each sample area.

V.2.5. Supplementary materials

The water samples were taken with a horizontal van Dorn type water sampler (Wilco, model Beta) previously cleaned with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) and thoroughly rinsed with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) in the laboratory. In the field, the sampler was rinsed with seawater from the site to be sampled before sampling. The seawater sampled was directly filtered using a syringe and a 0.2 μ m PES syringe filter. The syringe was previously rinsed three times with the sample. The filter was previously rinsed with a small volume of acid (0.1% v/v HCl, Trace Metal Grade, Fluka), 60 mL of Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), and then conditioned with a little sample before filtration.

Two liters of seawater is stored in a fluorinated ethylene propylene (FEP) bottle. These containers are, in the laboratory, previously rinsed three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), sterilized with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) for 24 hours under stirring, rinsed again three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) then filled with acid (0.1% v/v HCl, Trace Metal Grade, Fluka). In the field, the FEP container and bottle were rinsed three times with seawater from the site to be sampled.

Dissolved substances and heterotrophic communities were isolated by filtration during the experiment. In order to avoid possible contamination of the carbon filtrates, the 0.2 μ m polyestersulfone filters (Whatman, 47 mm) were previously washed with 100 mL of acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific), rinsed with 1L of Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), then packaged with 150 mL of the sample to be filtered. The GF/F glass fiber filters were previously calcined (450°C, 6h), rinsed with 1L of Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) then conditioned with 150 mL of the sample to be filtered.

All the FEP bottles used followed the same conditioning protocol described above.

The 24 mL glass tubes used for the DOC concentration and DOM fluorescence intensity analysis were previously rinsed three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore), sterilized with acid (10% v/v HCl, analytical grade, Fisher Scientific) for 24 hours, rinsed again three times with Milli-Q water (18.2 M Ω , Millipore) then calcined (450°C, 6 hours). At the time of sampling, they were rinsed three times with the sample before being filled.

V.3. Perspectives pour comprendre l'influence réelle des sédiments sur les propriétés chimiques et la croissance des procaryotes hétérotrophes

L'article IV a montré que, dans les zones côtières fortement urbanisées, de nombreuses sources peuvent être à l'origine des modifications des substances dissoutes avec un effet indirect sur le fonctionnement de la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique. Dans ces zones, il semble exister des influences localement plus fortes notamment dans un port de plaisance, ce qui pourrait correspondre aux résultats obtenus dans les études précédentes.

Cette étude a également permis de démontrer une importante influence des sédiments sur les substances dissoutes et indirectement sur la croissance des procaryotes hétérotrophes. Il est maintenant nécessaire de spécifier cette influence pour apporter plus de précisions sur les modifications chimiques, les consommations et les conséquences biologiques qui en découlent. L'article V présente l'approche expérimentale mise en place pour apporter ces précisions.

V.4. Re-suspension of Mediterranean harbour sediments: a source of phosphates that stimulates the heterotrophic base of the planktonic marine food web

Clara Dignan^{1*}, Cyrine Chouba², Léopold Matthys¹, Aurélien Domeau², Véronique Lenoble¹, Nicole Garcia², Elyne Dugeny¹, Jean-Claude Souche², Christelle Montigny², Benjamin Misson¹

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

²*Université de Montpellier, Hydrosociences, Montpellier, France*

³*Aix Marseille Univ, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO, Marseille, France*

* Corresponding author.

E-mail address: clara.dignan@univ-tln.fr

Article en préparation.

V.4.1. Abstract

Marine sediments can be an important reservoir of nutrient resources. Processes such as resuspension trigger the release of these trapped nutrients, making them available to the microbial community living in the water column. This work initially consisted in quantifying the changes in concentrations of dissolved substances during the resuspension of sediments from a harbour area (Carnon, France, Mediterranean NW). For this, different sediments from the same harbour were resuspended in seawater taken from the coastal area near the harbour. Resuspension was performed in lab for 14 days with a sediment/water ratio of 2.5 g_{ww}/L, under continuous stirring, at room temperature. The results show that phosphates were significantly released by all sediments, and over short resuspension times (30 min). A significant enrichment in dissolved organic carbon was observable with all the sediments after 2 weeks of resuspension. A significant enrichment in dissolved organic nitrogen was observable from 30 minutes of resuspension, only for the fine sediments. Dissolved inorganic nitrogen and dissolved organic phosphorus concentrations did not show any obvious enrichment trend. The composition of the dissolved organic matter evaluated through its fluorescent fraction appeared significantly enriched in humic substances for a single sediment, after 30 minutes of resuspension. In parallel, the influence of changes in dissolved nutrient concentrations observable after 30 minutes (corresponding to a resuspension pulse commonly observed in harbour areas) on the heterotrophic basis of the planktonic food web was evaluated by a second laboratory experiment. Each pool of dissolved substances obtained during the first experiment after 30 minutes was isolated by filtration and then inoculated with a natural community of heterotrophic prokaryotes collected next to the harbour. Net growth of heterotrophic prokaryotes was followed for 10 days at in situ temperature (12°C). It was largely stimulated by the modifications of dissolved substances caused by the resuspension, the maximum abundance reaching 2.6 times that observable in the control (dissolved fraction of the sea water used for the resuspension, without contact with sediments). In view of these results, we hypothesized that the resuspended sediments quickly lifted the phosphate limitation of the used seawater and favored the assimilation of dissolved organic matter, thus stimulating the heterotrophic base of the planktonic food web and increasing the carrying capacity of the system.

Keywords: sediment resuspension, biogeochemistry, nutrients, dissolved organic matter, heterotrophic prokaryotes, harbour

V.4.2. Introduction

Dissolved organic matter (DOM) is a complex mixture of components. It represents the main source of carbon and nutrients in the oceans (*Fisher and Likens, 1973; Meyers and Lallier-Verges, 1999; Brookshire et al. 2005; Seidel et al. 2016*). The marine DOM is one of the largest carbon pools on the planet (*Hedges et al., 1992; Hansell et al., 2009*) and an important and influential, though poorly resolved, component of global carbon cycle models (*Farrington, 1992*). Heterotrophic prokaryotes are the main consumers of DOM, channeling organic carbon into the food web through the microbial loop that converts up to 40 PgC into biomass each year (*Azam et al., 1983; Azam and Malfatti, 2007; Dittmar and Stubbins, 2014*). DOM comes from three major sources: autochthonous sources related mainly to primary production in the water column, allochthonous inputs that come from soil organic matter and from the degradation of terrestrial plants (*McKnight and Aiken, 1998; Mostofa et al., 2013*) and anthropogenic sources (*Pernet-Coudrier et al., 2008; Mostofa et al., 2010*). Thus, any marine DOM has an origin and a composition that reflect its local environment, characterized by its exposure to continental inputs and human activities. The processes inherent in an environment give its organic matter, through specific contributions and mechanisms, particular characteristics responsible for its unique reactivity.

The world's oceans act as a natural receptacle for dissolved and particulate matter (*Zabel and Schultz, 2000*). In coastal areas, the majority of allochthonous and autochthonous substances are exposed to different physical, chemical and biological processes. A significant portion of these nutrients are deposited in sediments before they can be used in the water column (*Peruoco et al., 2015*). Mineralization of organic matter in sediments often occurs under anaerobic conditions, at a slower rate compared to the oxygenated water column (*Aller, 1994*). As a result, sediments can be an important reservoir for organic matter and inorganic nutrients (*Peruoco et al., 2015; Soetaert and Middelburg, 2009*). Processes such as resuspension can trigger the release of these nutrients into the water column (*Reddy et al., 1996*).

The resuspension of sediments is a physical process that is ubiquitous in marine systems and particularly in coastal areas (*Vangriesheim and Khripounoff, 1990; Lee et al., 2005*). Coastal sediments are naturally resuspended and mobilized by wind and wave-induced water movement and currents (*Graf and Rosenberg, 1997*), processes that can lead to resuspension events for several days. Sediment resuspension can also be of anthropogenic origin, caused by dredging, boat maneuvers and trawling. These anthropogenic activities generally lead to sediment resuspension pulses that can last a few minutes. In generally shallow coastal waters, sediment-

water interactions are thus frequent and can have a significant impact on a multitude of important biogeochemical processes such as the mobilization of trace metals, nutrients and organic carbon (*Komada and Reimers, 2001; Komada et al., 2002; Koelmans and Prevo, 2003*). Resuspension of sediments can affect organic carbon and nutrient concentrations in natural waters through the dispersal of pore waters enriched in dissolved substances into overlying waters or through the desorption or displacement of organic matter bound to disturbed sediments (*Komada et al., 2002; Koelmans and Prevo, 2003*). Many studies have documented that organic matter is tightly associated with particles, and sometimes reversibly (*Hedges and Keil, 1999*). The resuspension and physical reworking of sediments can have a significant impact on their remineralization rates (*Sun et al., 2002; Arzayus and Canuel, 2005*) and could modify the distribution of organic matter between dissolved and particulate phases. For example, Komada and Reimers (*2001*) found that dissolved organic carbon (DOC) increased during resuspension of estuarine sediments mainly through the desorption of mineral-bound organic carbon. The fraction of readily releasable organic carbon was only a small fraction (0.3%) of sedimentary particulate organic carbon (POC) but was correlated with POC content (*Komada and Reimers, 2001*). Some studies have also demonstrated that sediment resuspension leads to nutrient fluxes to the water column (*Fanning et al., 1982; Koschinsky et al., 2001; Qin et al., 2004*). The study of biogeochemical balances suggests that the resuspension of sediments can therefore be a source of substances bioavailable for microbial communities (*Munawar et al., 1985; Borgmann and Munawar, 1989; Nayar et al., 2004*). Moreover, while physiological responses have long been identified and suggest stimulation of heterotrophic growth following sediment resuspension (*Munawar et al., 1985; Borgmann and Munawar, 1989; Nayar et al., 2004*), the combination between biogeochemical balances and microbial activities has rarely been studied with respect to this specific type of disturbance. Indeed, although these studies demonstrate the importance of the release of dissolved substances from resuspended sediments, they do not address the effect that these contributions may have on the heterotrophic base of the planktonic food web and thus on the fate of the DOM.

In this context, the objectives of this study were (i) to quantify the changes in dissolved substances according to the duration of resuspension of the sediments and their granulometric characteristics, then (ii) to document the effects on the heterotrophic base of the planktonic food web caused by these changes. Resuspensions of coastal sediment were performed in the laboratory. They were carried out with three sediments of different granulometry sampled in a harbour. The concentrations of dissolved substances (DOC, dissolved organic nitrogen (DON), dissolved inorganic nitrogen (DIN), dissolved organic phosphorus (DOP) and dissolved

inorganic phosphorus (DIP)) were monitored during 14 days of resuspension. In parallel, the effect of the dissolved fraction on the growth of the heterotrophic prokaryotes after a sediment resuspension pulse representative of harbour phenomena was studied. To do this, the dissolved fraction was isolated after 30 minutes of resuspension in the first experiment series and exposed to a microbial community for 10 days at *in situ* temperature to get as close as possible to natural conditions and in the dark to avoid any new phytoplankton production.

V.4.3. Material and methods

V.4.3.1. Study area and sample collection

The site studied is the Carnon harbour (43°32'42"N, 3°58'26"E), located in France at 15 km south-east of Montpellier, on the coast of the North-Western Mediterranean (*Figure V.6*). This marina has a capacity of 800 places afloat and has two careening areas as well as a refueling pump. It has the particularity of being intersected by a channel connecting two lagoons (“Etang de l’Or” and “Etang de Pérols”) as well as the Canal du Rhône in Sète to the Mediterranean Sea. It is therefore located on a transition system between the continent and the Mediterranean Sea and exposed to a particular hydrological context. Surface sediment samples were taken with an Eckman-type grab on March 20th, 2023 at the SF_R, SF_O and SS stations (*Figure V.6*). These stations were chosen because they represented the diversity of the harbour’s sediments (granulometry varying according to the hydrodynamics, recent or old sediments outcropping after dredging). Sediment was transferred to a 50 mL Falcon tube, transported to the laboratory, and stored at 4°C until the start of the experiment (~ 4 days). Moreover, a sample of surface water was also taken using a Van-Dorn bottle at a station located outside the harbour (station C, *Figure V.6*) and not being a priori not affected by harbour activities and lagoon water (salinity = 38, temperature = 12°C). This choice made it possible to maximize the amplitude of the transfers between sediments and water and to facilitate their quantification. Water samples were transferred to 20L LDPE bottles. In order to avoid any major modification of the chemical and biological properties, the samples were brought back to the laboratory and treated immediately in order to launch the experiments as soon as possible (< 12h). All the equipment used during water sampling has undergone a washing and conditioning protocol before use in order to avoid any contamination.

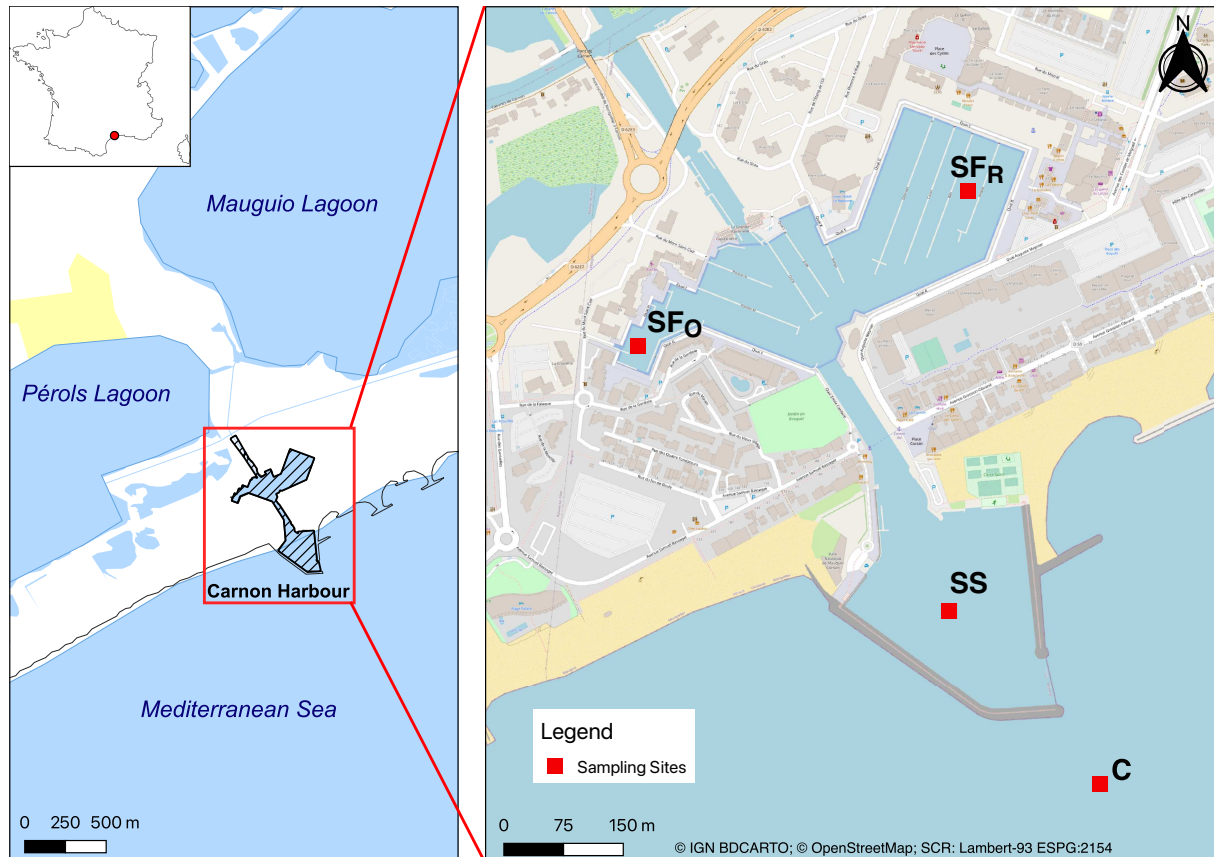


Figure V.6 : Map of the study site and sampling points. C: sea water from outside the harbour, SS: sandy sediments, SF_O: old fine sediments, SF_R: recent fine sediments.

V.4.3.2. Laboratory resuspension experiments

Before any manipulation, all the material used has been previously conditioned, all the conditioning protocols are available in the additional material. Each sediment was added to 2L of water from station C at a ratio of 2.5 g of wet sediment per liter of seawater, in 2L FEP (fluorinated ethylene propylene) bottles. A control condition with water from station C without any sediment was also performed. Each condition was performed in triplicate. The 2L FEP bottles were subjected to head-over-head shaking (11 rpm, Heidolph). In order to characterize the changes induced by the contact with the sediments, the initial water of station C was sub-sampled before the start of the experiment and the water-sediment mixtures and the control condition were then sub-sampled after 30 mn, 1 day and 14 days taking the necessary precautions to avoid contamination. To assess DOC concentration, 24 mL subsamples were filtered through 0.2 µm polyethersulfone (PES, 33 mm) syringe filters, collected in preconditioned glass tubes, acidified (10% v/v HCl, Analytical Grade, Fisher Scientific) and stored at 4°C. Following the same filtration protocol as for the DOC measurement, 24 ml of

filtered water were stored in preconditioned glass tubes at 4°C for further evaluation of the fluorescent fraction of DOM (FDOM). For nutrients concentration measurements (DIN, DON, DIP, DOP), subsamples (50 mL) were filtered through 0.2 µm polyestersulfone (PES, 33 mm) syringe filters, collected in centrifuge tubes (Falcon) and stored at -20°C while waiting. After 30 mn of agitation, the water-sediment mixtures and the control condition were also subsampled in order to recover the dissolved fraction of each condition for the incubation experiments. For this, 200 mL were collected in each condition, filtered through a preconditioned PES filter (Whatman, 0.2 µm, 47 mm) and then stored in 500 mL FEPs at *in situ* temperature (12°C).

V.4.3.3. Laboratory incubation experiments

In order to assess the potential for stimulation of the heterotrophic base of the planktonic food web by the release of dissolved nutrients, incubation experiments were then carried out according to the method described by Dignan et al. (submitted a). Briefly, the experiments consisted of incubating each pool of dissolved substances isolated after 30 minutes of sediment resuspension (or shaking for condition C) with the heterotrophic prokaryotic community collected from station C (*Figure V.7*). For this, 72 mL of the dissolved pool from each condition was incubated in 125 mL FEP bottles with 8 mL of C-site water containing a natural community of heterotrophic prokaryotes. This community was isolated from most primary producers and eukaryotic predators by filtration <0.7 µm (GF/F, Whatman, 47 mm). All bottles were then incubated at *in situ* temperature (12°C) in the dark (to avoid phytoplankton production of fresh DOM) for 10 days. To follow the growth of HP, subsamples (1 mL) were taken immediately after inoculum (T0) and after 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 10 days of incubation, then fixed with glutaraldehyde (0.25% final concentration) and stored at -80°C until HP enumeration by flow cytometry. To follow the concentration of DOC as well as the composition of the fluorescent DOM (FDOM), sub-samples were taken as described above at the initial (T0) and final time of the incubation (Tf).

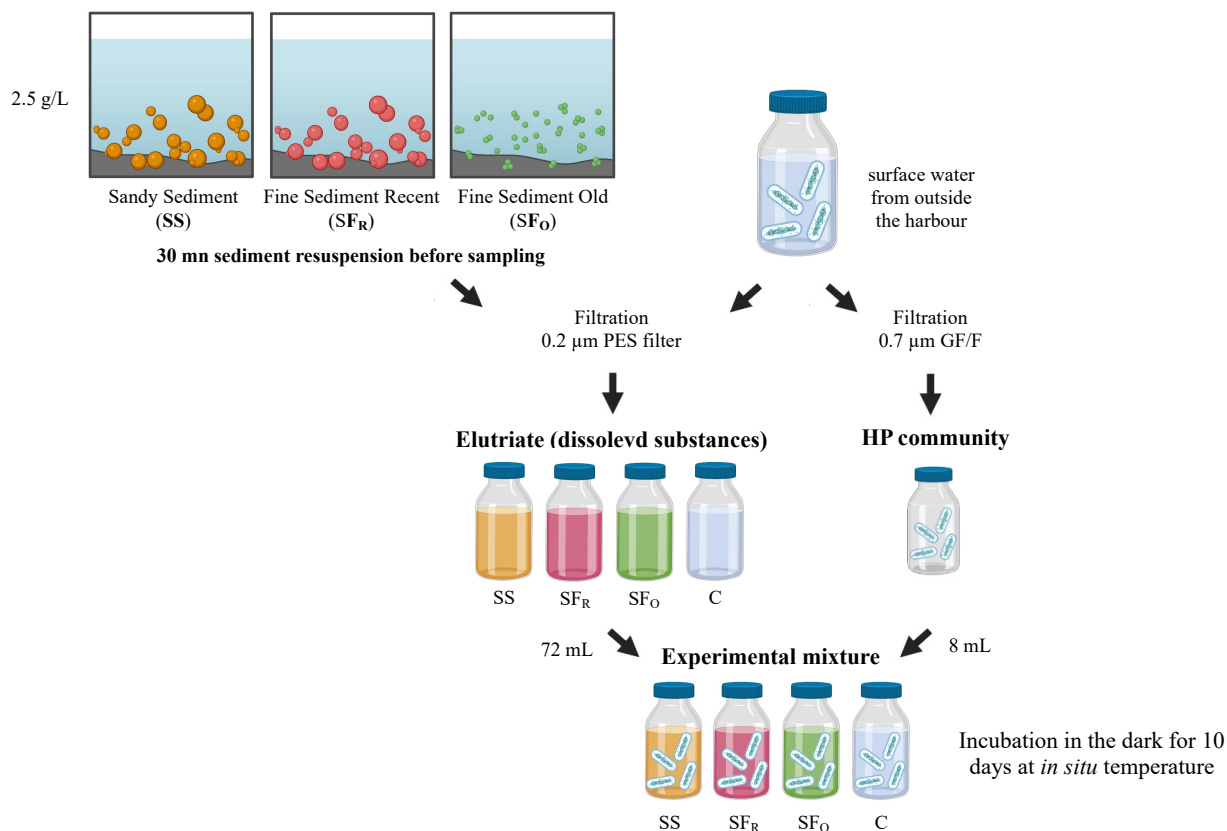


Figure V.7 : Experimental design

V.4.3.4. Chemical analyses

DOC concentrations were determined by high temperature catalytic oxidation using a Shimadzu TOC-VCSH carbon analyzer with an accuracy of 0.1 mgC.L^{-1} . The DOC analyses have been validated by comparison with the consensus reference material DOC (SUPER-05) (Hansell, 2005).

Nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) and phosphate (PO_4^{3-}) ions were measured by colorimetric methods by automated Technicon Autoanalyse III (Tréguer and Le Corre, 1975). The concentrations of total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) were determined using a wet oxidation technique (Raimbault et al., 1999). The concentrations of DON and DOP were deduced by subtracting respectively the concentrations of nitrate and nitrite from the concentration of total nitrogen, and the concentration of phosphate from the concentration of total phosphorus.

The DOM quality was evaluated by characterization of the fluorescent fraction of the DOM. The three-dimensional excitation-emission (EEM) matrices of each subsample were recorded using a Fluoromax+ spectrofluorimeter (Horiba) using a 1 x 1 cm quartz cell. EEMs are used

to distinguish fluorescence signals due to various groups of chromophores. The excitation wavelength varied between 220 and 450 nm in 5 nm increments, while the emission was measured between 220 and 600 nm. Using the drEEM toolkit (*Murphy et al., 2013*), the EEMs were corrected from the EEM of Milli-Q water measured under the same conditions. EEMs were developed to suppress and interpolate Rayleigh and Raman scattering peaks. EEMs were normalized to the Raman signal of water, by dividing the fluorescence by the integrated Raman band of Milli-Q water ($\lambda_{ex}=350$ nm, $\lambda_{em}=371-428$ nm), measured on the same day of the analysis. Thus, the intensity of fluorescence is expressed in Raman units (R.U.) (*Lawaetz and Stedmon, 2009*). The EEMs collected from the simulation experiment of sediment resuspension and those collected from the incubation experiment were analyzed separately. The PARAFAC analysis performed on the EEMs was performed in MATLAB R2018a (Mathworks, Natick, MA) using two to seven component models with non-negativity constraints. The final four-component model was chosen for each experiment based on residual analysis and visual inspection (*Stedmon and Bro, 2008*).

V.4.3.5. Heterotrophic prokaryotes abundances (HPA)

After thawing, the samples were labeled with SYBR Green (final concentration 1X) for 15 minutes in the dark and the HPs were counted with an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences). Fifty microliters were analyzed at a flow rate of 35 $\mu\text{L}\cdot\text{mn}^{-1}$. Non-fluorescent polystyrene microspheres (Flow Cytometry Size Calibration Kit, Thermo Fisher Scientific) were used as the size standard. The particles considered as HP were smaller than 2.0 μm , exhibited low complexity (low SSC), emitted significant green fluorescence and very weak red fluorescence (*Grégori et al., 2001*). Data was acquired using BD Accuri CFlow Plus software and HPA expressed in cells per milliliter ($\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1}$).

V.4.3.6. Statistical analyses

All statistical analyzes were performed with RStudio 2022.7.0.548 software (RStudio Team, 2022) under R 4.2.2. After checking the normal distribution and homoscedasticity of the variances with Shapiro's and Levene's tests, respectively, analyzes of variance (ANOVA) were used to compare the nutrient concentrations during the sediment resuspension simulation in each experimental condition using the rstatix package. If the ANOVA detected a significant difference ($p\text{-value} < 0.05$), a paired t-test, with Bonferroni's method for p-value correction, was then used to distinguish which samples were significantly different from others. (p-

value < 0.05). ANOVA was also used for HPA comparisons during the incubation experiment. Student's t-tests were used to compare the mean initial and final values of DOC concentrations and fluorescence intensities of the different FDOM components for each condition of the incubation experiment.

V.4.4. Results & discussion

V.4.4.1. Variations of physicochemical parameters during sediment/seawater mixing

For the sediment resuspension simulation experiments, the initial DOC concentration in seawater was $92.2 \mu\text{M}$. This DOC value is similar to the range of concentrations commonly found in the coastal area of the northwest Mediterranean Sea (*Santinelli, 2015; Coclet et al., 2018, 2019; Dignan et al., submitted b*). In the control condition (C) and with the sandy sediments (SS), DOC concentration remained unchanged ($p\text{-value} > 0.05$). Both with the recent and old fine muddy sediments (SF_R and SF_O) an increase ($p\text{-value} < 0.05$) in the concentration was observed after 14 days of resuspension to reach 112.1 and $99.5 \mu\text{M}$, respectively (*Figure V.8*). This release of DOC is in agreement with previous similar studies carried out in different aquatic environments (*Guigue et al., 2017; Dadi et al., 2017; Guo and Santschi, 2000*). The difference between sandy and muddy sediments could be due to the differences in specific surfaces of the sedimentary particles and the organic matter content of the sediments. Indeed, the organic matter content of sediments is known to be correlated to the exchange surface of the sediments (*Mayer, 1994*). On the other hand, larger sandy sediments have a smaller specific surface. Therefore they have a reduced exchange potential on particle surfaces compared to muddy sediments. The significant increase in DOC concentration that appeared only after 14 days of agitation with the muddy sediments suggests that the transfer of DOC from the sediments to the water column followed slow kinetics. Resuspension of sediments can affect DOC concentrations instantaneously by dispersion of nutrient-enriched interstitial waters or by desorption phenomena which require a longer time for particle-bound DOC to be transferred to the water column (*Hedges and Keil, 1999; Komada et al., 2002; Koelmans and Prevo, 2003*). Thus, the observations made during the present study suggest that the enrichment in DOC would be mainly linked to a desorption phenomenon. Komada and Reimers (*2001*) also found that DOC increased during resuspension of estuarine sediments was primarily due to the desorption of mineral-bound organic carbon. The fraction of readily releasable organic carbon was only a small fraction (0.3%) of sedimentary particulate organic carbon but was correlated with POC content (*Komada and Reimers, 2001*).

In the present study, the initial concentrations of DON and DOP were 5.1 μM and 0.1 μM , respectively. The initial concentrations of DIN and DIP were 16.7 μM and 0.007 μM , respectively. All of these values are within the range of mean oceanic and coastal concentrations. However, the DIN concentrations were slightly higher than the concentrations commonly found in the Mediterranean Sea (*Hansell and Carlson, 2002; Bogé et al., 2012; Coclet et al., 2019*). The DON concentration did not significantly vary under the C and SS conditions. A significant increase in DON concentration was measured under SF_R and SF_O conditions, detected from 30 minutes of shaking and reaching the maximum values after 14 days by doubling and tripling, respectively, compared to the initial time. A significant increase in DIP concentration was observed in all conditions containing sediment after 30 minutes of agitation to reach maximum values 4 to 5 times higher after 14 days than in the initial water. No significant variation was observed in condition C. DIN concentrations varied little in all conditions except for a few significant increases that were very specific to certain conditions (*Figure V.8*). The DOP concentrations remained unchanged in all conditions, no significant difference could be demonstrated. The sediment resuspension therefore resulted in a significant and almost instantaneous release of DIP whatever the considered sediment, and of DON with fine muddy sediments. These results are consistent with many studies that have also found organic and inorganic nutrient release following sediment resuspension (*Qin et al., 2004; Takasu et al., 2020; Wu et al., 2020*). The differences observed between the SS, SF_R and SF_O conditions demonstrate the great heterogeneity of the effect that can occur on a very small geographical scale in a harbour.

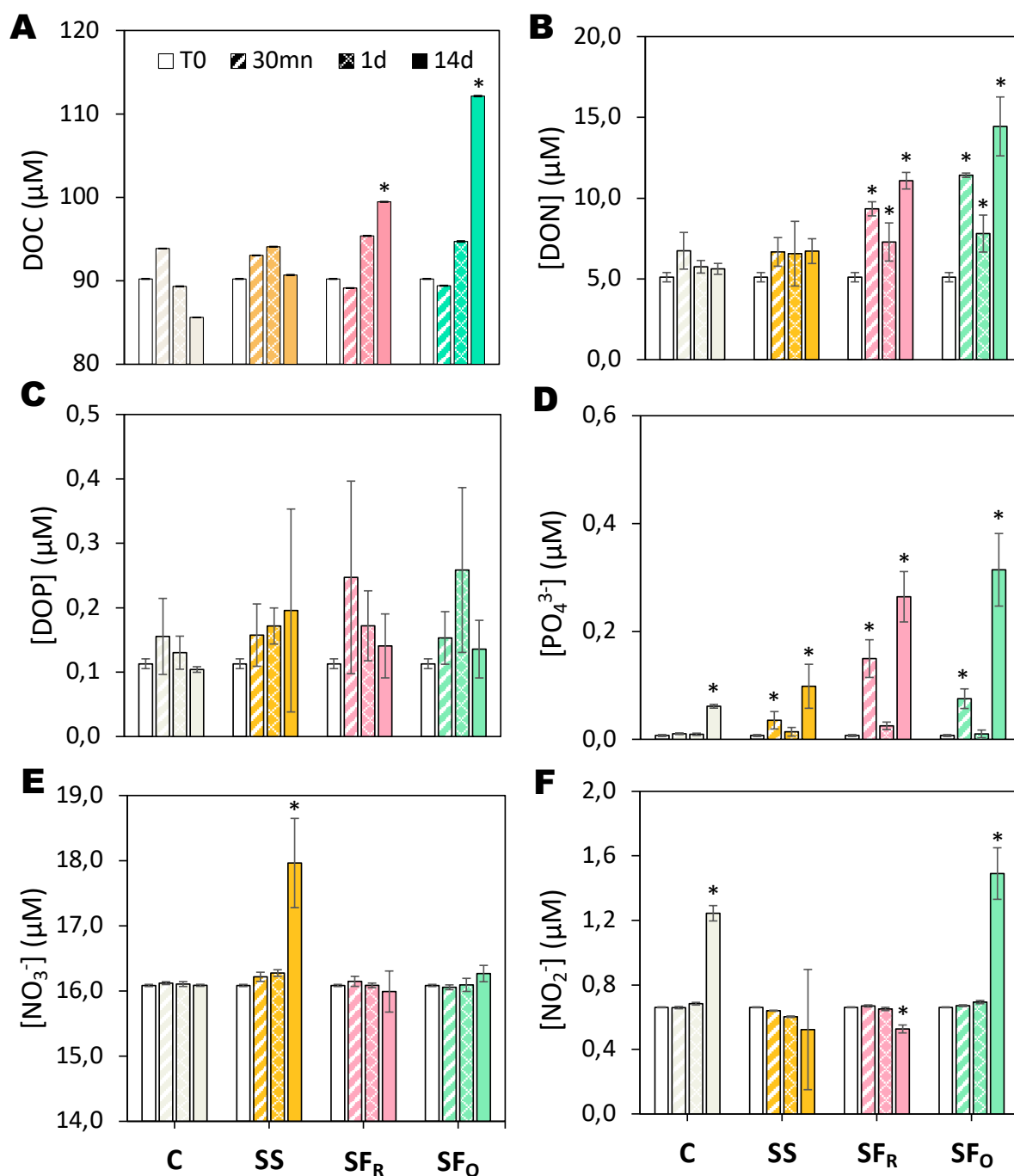


Figure V.8 : variation in DOC (A), DON (B) and DOP (C), phosphate (D), nitrate (E) and nitrite (F) concentrations during sediment/seawater mixing under different conditions. Significant differences from the initial time of each condition are indicated by a star.

The study of the fluorescent fraction of the DOM and the PARAFAC analysis of the EEMs validated a model of four fluorescent components: two humic components, marine and terrestrial humic-like, and two proteic components, tryptophan and tyrosine-like. Under conditions C and SS, the fluorescence intensity of the 4 components remained stable during the 14 days of resuspension. In the SF_R conditions, from 30 mn of shaking, the fluorescence

intensities of the C1_{MarineHumic-like} and C2_{TerrestrialHumic-like} components significantly increased. The fluorescence intensities were up to 2.5 times higher than the initial values and those of the C condition. In the SF₀ condition, only the C1_{MarineHumic-like} component showed a significant increase, and only after 14 days of the sediment/sea water agitation (*Figure V.9*). These data seem to indicate that sediment resuspension can lead to a modification of the composition of the fluorescent fraction of the marine DOM. These results are in agreement with other studies that have shown release of humic-like DOM upon resuspension (*Harfmann et al., 2021*). Conversely, Takasu et al. (*2020*) showed that the fluorescent fraction of the DOM did not undergo any change following the resuspension of muddy sediment from an estuary during a tidal episode. So, as for nutrients, our study converges with the literature to demonstrate that the influence of resuspended sediments on the composition of the DOM seems very irregular and depends on resuspension time as well as on the properties of the sediments. This influence can therefore vary on a very small geographical scale, such as inside a harbour.

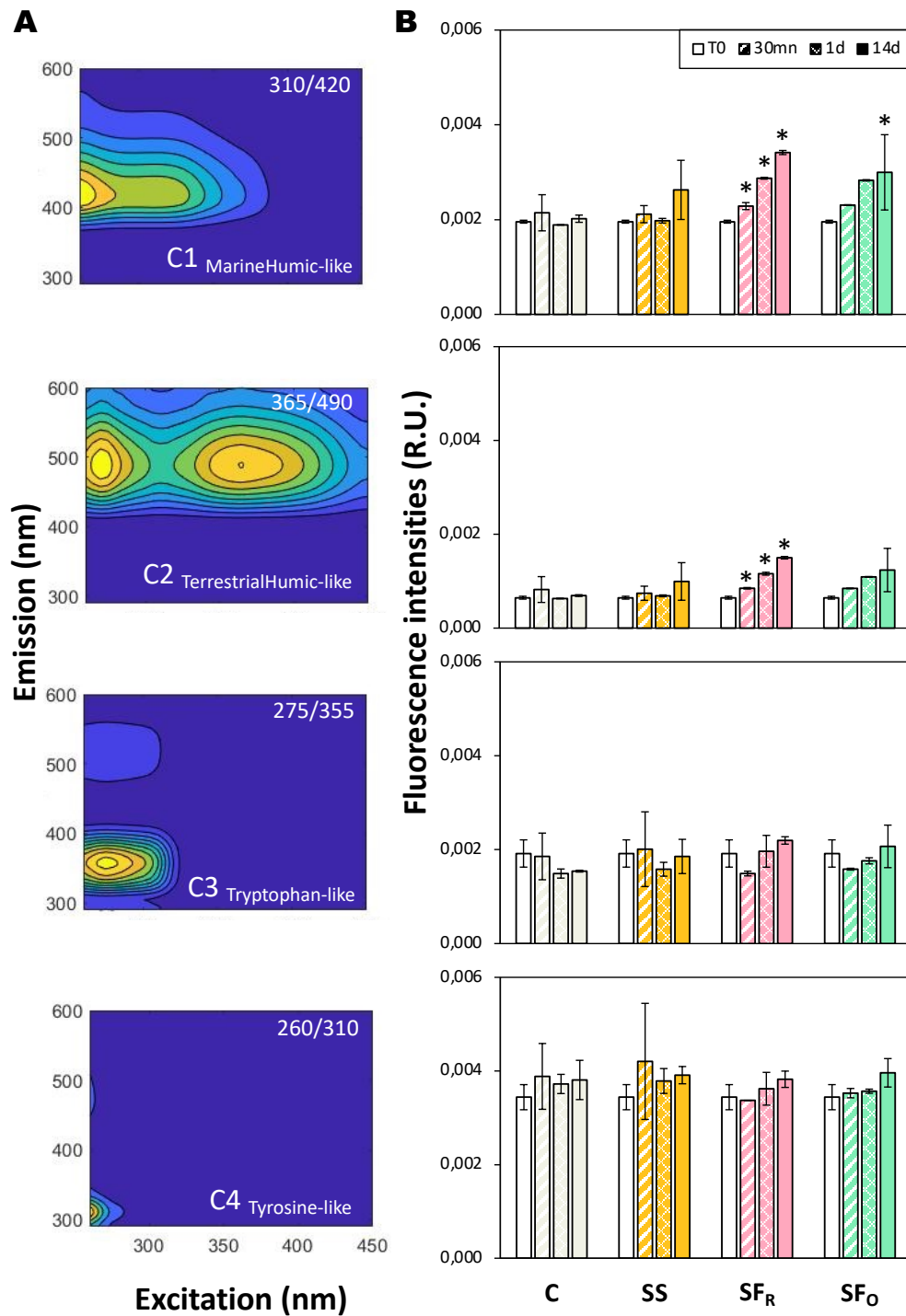


Figure V.9 : (A) Fluorescence signatures of the four compounds identified by PARAFAC analysis: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 tyrosine-like. The contour plots of the C1 - C4 components are ordered by decreasing percentage explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing relative emission intensity. (B) Relative changes in fluorescent intensity during sediment resuspension simulation for each condition. The stars represent a significant difference with the initial incubation time.

V.4.4.2. Resuspension pulse stimulates the growth of heterotrophic prokaryotes

An HP community was incubated with the dissolved substances sampled in the resuspension experiments after 30 minutes of mixing. During these incubation experiments, the abundance of heterotrophic prokaryotes (HPA) increased in all conditions. However, the use of dissolved substances modified by the resuspension of sediments resulted in a net growth up to 2.6 times higher than the dissolved substances of C condition. Several phases were observable: a lag phase the first two days, an exponential growth phase between the 2nd and 3rd day of incubation before a slowdown and relative stability of the HPA when the community has reached the carrying capacity of the system (*Figure V.10*). No obvious differences in carrying capacity were observed between the pools of dissolved substances modified by the resuspension of sediments.

The SS condition exhibited a decrease in HPA after 6 days of incubation followed by a slight increase. Sediment resuspension is also known for its potential to trap viral particles in suspension (*Maat et al., 2019a, b*). The SS condition coming from the resuspension of coarser sediments, with a low exchange surface, it is then conceivable that the viral particles or viruses naturally present in the seawater had been less trapped on the sedimentary particles and could thus represent a higher HPA control pressure than in the other conditions. A specific study of these interactions is now necessary to test this hypothesis.

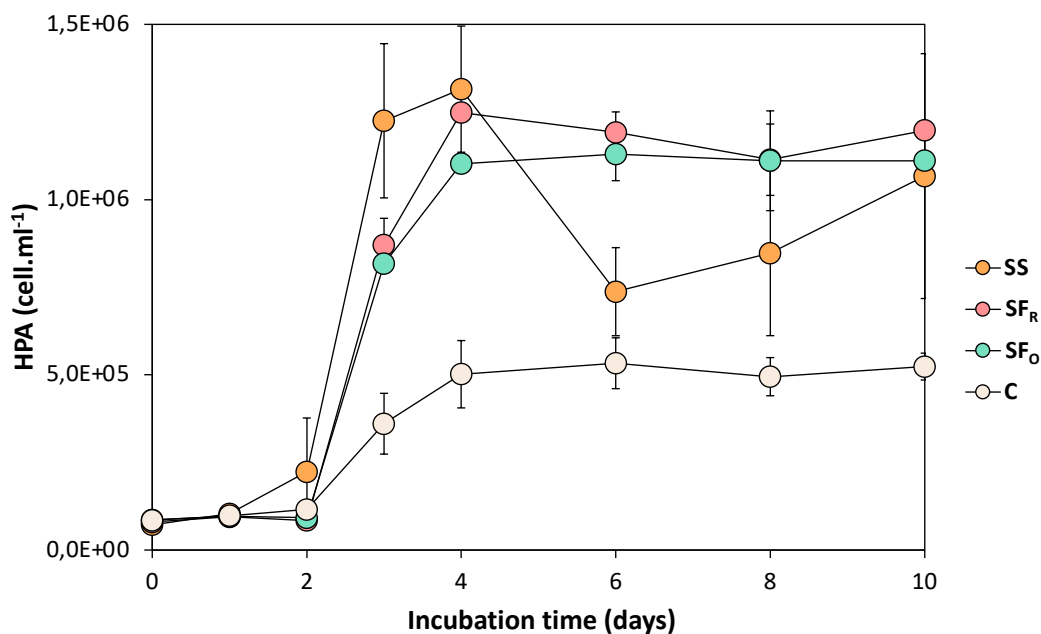


Figure V.10 : Heterotrophic prokaryotes abundance (HPA) for each condition during the incubation experiment. The error bars refer to the standard deviation between the replicates.

The initial DOC concentrations were equivalent between the conditions. In addition, DOC consumption did not consistently appear to be higher under the conditions corresponding to the resuspension of sediments compared to the control (*Figure V.11*). The stimulation of HP growth following the resuspension of sediment did not seem to be linked to a greater availability of DOM. However, the significant decrease in DOC was observed in the SS condition and the large variability observed in the SF_R and SF_O conditions calls for the repetition of this type of study for more robustness.

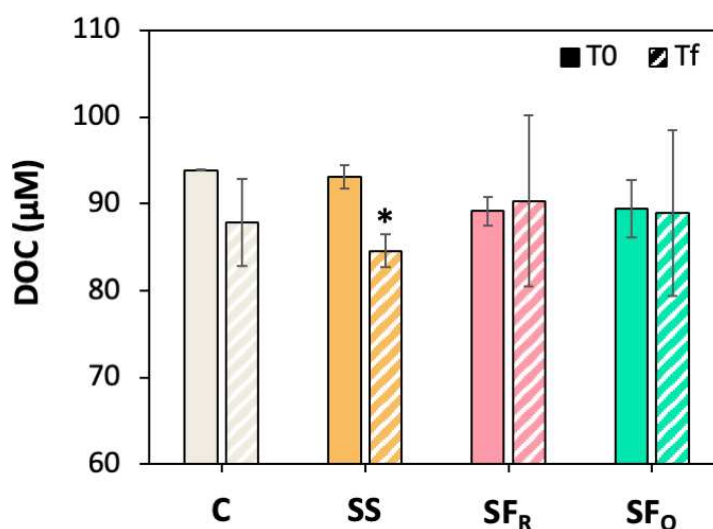


Figure V.11: Comparison of the DOC concentration dynamics at the initial (filled colors) and final (thin hatching) time of the incubation experiment for each condition. Error bars indicate the standard deviation of triplicate experiments. The stars represent a significant difference between the initial and final incubation time.

The study of the DOM fluorescent fraction during the incubation experiments and the PARAFAC analysis of the EEMs validated a model of four fluorescent components identical to those previously identified for the resuspension experiment (*Figure V.12*). Fluorescence intensities of the C2_{TerrestrialHumic-like} component slightly increased over time (up to + 40%) under SF_R and SF_O conditions. Conversely, the fluorescence intensity of the C1_{MarineHumic-like} component significantly decreased in the SS condition (- 18%). These specific variations to certain conditions cannot explain the systematic stimulation of HP growth following the modification of dissolved substances by the resuspension of sediments. Thus, a change in DOM fluorescent composition appears to stimulate the heterotrophic basis of the planktonic food web. However, depending on the nature of the sediments, the changes in DOM composition are not the same. This heterogeneity highlights an intriguing variability in the fate of marine DOM under the influence of the microbial loop after sediment resuspension.

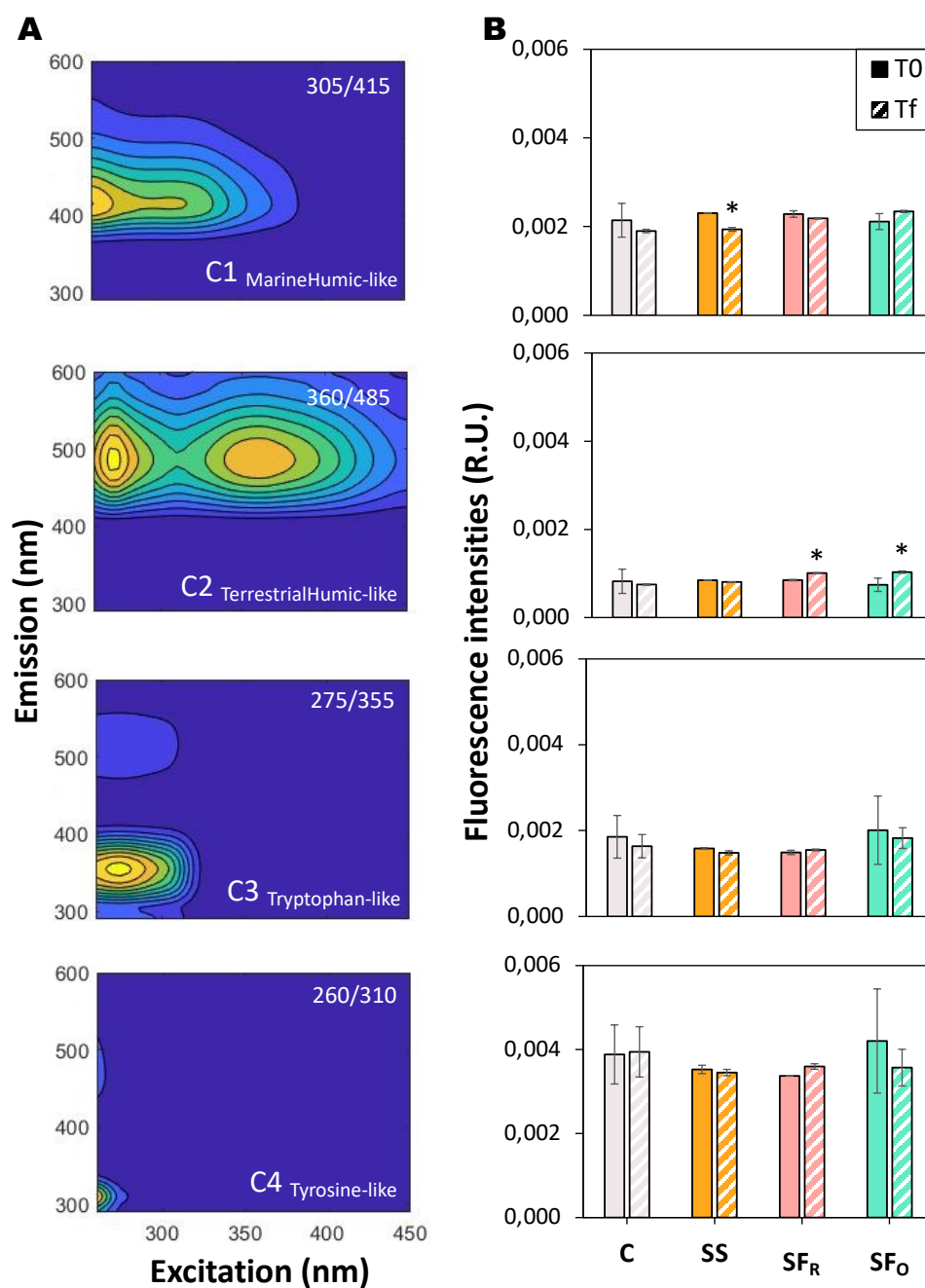


Figure V.12 : (A) Fluorescence signatures of the four components identified by PARAFAC analysis: C1 marine humic-like, C2 tryptophan-like, C3 terrestrial humic-like, C4 tyrosine-like. The contour plots of the C1 - C4 components are ordered by decreasing percentage explained, with emission wavelength on the y-axis, excitation wavelength on the x-axis, and shading representing relative emission intensity. (B) Relative changes in fluorescent intensity at the initial and final time of the incubation experiment for each condition. The stars represent a significant difference with the initial incubation time.

DOM properties are not the only bottom-up control factors of HP growth, N and P availability being another essential factor for the functioning of the microbial loop (*Thingstad et al., 1998; 2005*). In our resuspension experiments, after 30 minutes, only the phosphate concentration had increased in all conditions containing sediment compared to the initial water. This increase could have lifted the limiting character of phosphate commonly demonstrated in the Mediterranean Sea (*Van Wambeke et al., 2002; Lucea et al., 2003; Pinhassi et al., 2006; Bogé et al., 2012*). The DON enrichment observed after 30 mn of sediment resuspension under SF_R and SF_O conditions did not enhance HP growth, suggesting the absence of nitrogen limitation in our study. The high initial concentration of nitrates in the seawater used tends to support this hypothesis.

This study made it possible to show that the resuspension of sediments leads to different modifications of the chemical composition of the dissolved fraction of seawater at different time scales and depending on the initial properties of the sediments. While the changes observed after 14 days seem unrepresentative of a natural situation of resuspension, those observed after 30 minutes do represent a range of harbour situations. They are associated with a strong potential for stimulation of the heterotrophic base of the planktonic food web, for which the remobilization of phosphates seems to be a key factor for the Mediterranean coastal system studied.

V.5. Conclusion du chapitre

Les résultats des deux études présentées dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence une influence de la colonne sédimentaire en zone côtière qui entraîne une modification des propriétés des substances dissoutes. La colonne sédimentaire peut libérer, par diffusion, bioturbation ou suite à une remise en suspension, des nutriments et une matière organique modifiée qui peuvent avoir une influence sur la croissance des procaryotes hétérotrophes. En effet dans la première étude, une forte influence de la colonne sédimentaire a été mise en évidence dans une baie fortement urbanisée grâce à l'utilisation de radioéléments. Ces influences sédimentaires semblaient associées à un apport d'azote organique dissous, de phosphore inorganique dissous et d'une matière organique dont la composition était modifiée. La deuxième expérience, en simulant une remise en suspension, a permis de confirmer la libération de phosphates par les sédiments. Elle a également mis en évidence une grande variabilité de modifications chimiques observables selon la nature des sédiments. De plus, les apports sédimentaires semblaient dépendre du temps de remise en suspension. Ainsi, l'influence de la colonne sédimentaire sur les substances dissoutes dans la colonne d'eau peut donc être très hétérogène.

Dans un second temps, l'influence des modifications de la fraction dissoute dues aux apports sédimentaires sur la croissance des procaryotes hétérotrophes a été étudiée dans les deux études présentées dans ce chapitre. Dans les deux études, les substances dissoutes sous influence des sédiments ont stimulé la croissance des procaryotes hétérotrophes. La constance des réponses biologiques suggère qu'un pulse de resuspension ou un temps de contact bref avec les sédiments peuvent être une source de substances dissoutes biodisponibles pour les communautés de procaryotes hétérotrophes planctoniques. Cependant, entre les deux études présentées dans ce chapitre peu de cohérence sur les modifications chimiques entraînées par les apports sédimentaires ont été observées. Pour approfondir la réflexion sur les modifications chimiques qu'entraîne la colonne sédimentaire et expliquer les différences de croissance des procaryotes hétérotrophes il conviendrait d'étudier plus finement la composition de la DOM.

CHAPITRE VI.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

VI.1. Rappel des objectifs de la thèse

Dans un contexte général d'importantes influences continentales et anthropiques en zone côtière Méditerranéenne, les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments relatifs aux variations de biodisponibilité de la DOM pour les procaryotes hétérotrophes.

Le premier objectif de ces travaux a consisté à caractériser les variations spatio-temporelles des propriétés de la DOM et des concentrations en nutriments dans deux zones côtières sous influences continentales et anthropiques contrastées. En parallèle, le soutien de croissance des communautés de procaryotes hétérotrophes a également été étudié afin d'apporter une vision plus intégrative des propriétés de la DOM.

Le second objectif consistait à comprendre le lien entre ces propriétés de la DOM, sa labilité et son utilisation par les procaryotes hétérotrophes à travers une approche expérimentale avec des analyses plus approfondies.

Le troisième objectif était d'évaluer, par une approche combinée d'observations et d'expérimentations, la contribution du compartiment sédimentaire en tant que source potentielle de substances dissoutes pouvant expliquer les variations spatio-temporelles observées.

Pour répondre à ces objectifs, plusieurs campagnes de terrain (*i.e.* prélèvements d'eau de mer, suivi mensuel à long terme) ainsi que des expérimentations en laboratoire ont été nécessaires. Ces deux approches complémentaires ainsi que la pluridisciplinarité des techniques d'analyse utilisées (*i.e.* chimie analytique, cytométrie en flux et biologie moléculaire) ont permis d'apporter un ensemble d'éléments nouveaux vis-à-vis des propriétés de la DOM et de sa prise en charge par les procaryotes hétérotrophes en zone côtière Méditerranéenne sous influences continentale et anthropique contrastées.

Ce chapitre a pour objectif de discuter de manière plus approfondie les questions rencontrées au cours de ces travaux de thèse et de proposer des perspectives permettant d'ouvrir de

nouvelles pistes de réflexion. Il présente dans un premier temps les réponses aux questions autour de la variabilité spatio-temporelle des facteurs abiotiques en zone côtière. Dans un second temps, le rôle de la qualité de la DOM comme indicateur de sa biodisponibilité et le rôle des nutriments dans sa prise en charge par les procaryotes hétérotrophes seront discutés. Pour finir, une réflexion autour du devenir de la DOM à travers la boucle microbienne sera détaillée.

VI.2. Hétérogénéité spatio-temporelle des facteurs abiotiques en zone côtière

Dans les zones côtières, la DOM est un mélange très complexe et dynamique de composés dérivés à la fois de sources naturelles et d'apports anthropiques (*Bauer et al., 2011 ; Cawley et al., 2012 ; Artifon et al., 2019*). L'origine de la DOM influence sa composition et ses propriétés, qui vont ensuite déterminer sa réactivité dans les écosystèmes aquatiques (*Besemer et al., 2009 ; Lambert et al., 2017*). La DOM joue un rôle essentiel dans les écosystèmes aquatiques de surface en raison du nombre de processus biogéochimiques dans lesquels elle intervient. Quelle que soit sa source, elle joue un rôle central sur la nature du métabolisme (hétérotrophe ou autotrophe) du milieu. La DOM influence également la spéciation, la solubilité, la toxicité et le transport des polluants organiques et inorganiques (*Buffle, 1988 ; Campbell, 1995*). Elle est aussi impliquée dans les réactions photochimiques, le cycle et la disponibilité des nutriments (*Bormann et Likens, 1967 ; Nebbioso et Piccolo, 2013*). Les mécanismes impliqués dans tous ces processus dépendent non seulement de la quantité de DOM, mais aussi de sa nature chimique, de ses propriétés physico-chimiques et de sa composition. Les propriétés de la DOM dans les eaux naturelles peuvent être sujettes à des variations temporelles de différents niveaux. Celles-ci peuvent être observées sur de courtes périodes (événements orageux, vents, variations de température, etc.) ou sur de longues périodes à l'échelle de la saison. Les activités humaines, notamment dans les zones côtières fortement urbanisées, peuvent modifier les propriétés de la DOM en raison des apports anthropiques provenant par exemple des rejets de station de traitement des eaux usées, du lessivage des sols ou encore des rejets par les navires. Malgré leur rôle clé dans les processus environnementaux, les variations spatio-temporelles de la quantité, la composition et la réactivité de la DOM sont encore trop peu connues.

VI.2.1. Variations temporelles

Dans la rade de Toulon, les concentrations en DOC ont varié de 60 à 115 μM sur la période étudiée (article I, II, III, IV). Au cours du suivi temporel réalisé en 2021 (article II, chapitre III),

la concentration en DOC a progressivement augmenté de janvier à juillet, reflétant les variations climatiques saisonnières. Les mesures de carbone réalisées dans l'article I (chapitre III) en mars, juillet et novembre 2020 présentaient également la même tendance. Plusieurs facteurs peuvent contrôler la quantité de DOC, dont la production de DOC par le phytoplancton, la composition de la DOM libérée et la consommation hétérotrophe (Avril, 2002 ; Santinelli et al., 2015, 2020). Une accumulation de DOC se traduit généralement par une production supérieure à la consommation. Ainsi, l'augmentation de la concentration de DOC enregistrées dans les travaux présentés (article I, II, chapitre III) pourrait provenir en partie d'une production phytoplanctonique plus élevée et d'une consommation réduite au printemps et en été. Cependant, aucune augmentation significative de la concentration en chlorophylle a, témoignant d'une activité phytoplanctonique plus importante, n'a été observée au cours de ces travaux. La concentration en chlorophylle a est restée stable ou augmentait ponctuellement à certaines dates de prélèvement. Ces observations suggèrent que l'accumulation de DOC mesurée est davantage liée à une plus faible consommation par les microorganismes hétérotrophes qu'à une augmentation de la production primaire.

L'hypothèse d'une consommation plus faible par les microorganismes hétérotrophes plutôt qu'une production primaire plus forte est soutenue par d'autres scientifiques qui ont montré que dans certaines zones de la mer Méditerranée, la communauté microbienne est incapable de consommer le DOC qui s'accumule, entraînant un affaiblissement de la boucle microbienne et plus d'énergie stockée sous forme de DOC semi-labile (Bachi, 2022). De nombreux facteurs peuvent contrôler la consommation du carbone par les microorganismes hétérotrophes. Le facteur le plus couramment cité dans la littérature est la limitation en azote (N) et en phosphore (P). En effet, l'hypothèse de dysfonctionnement de la boucle microbienne sous-entend que la consommation bactérienne peut être limitée par la disponibilité en N et P (Zweifel et al., 1993 ; Cotner et al., 1997). Une faible croissance bactérienne et une biomasse maintenue à de faibles niveaux par la concurrence pour les nutriments pourraient ralentir la consommation de DOC et permettre son accumulation. La mer Méditerranée est un bassin oligotrophe limité en P. Des études antérieures ont montré que le manque de P limite la croissance hétérotrophe dans l'Est de la mer Méditerranée (Krom et al. 1991 ; Van Wambeke et al. 2002). Une activité bactérienne accrue en réponse aux ajouts de nutriments inorganiques a été observée expérimentalement (Psarra et al. 2005 ; Pitta et al. 2016), ce qui a conduit à la conclusion que les communautés bactériennes n'étaient pas capables de se développer en raison de la limitation des nutriments. D'autres études menées dans les océans n'ont pas détecté d'augmentation de la production hétérotrophe ou de changement de la concentration de DOC après l'amendement de N et P. La

production hétérotrophe n'était donc pas limitée par la disponibilité des nutriments et la labilité biologique du DOC pourrait être le facteur limitant de la croissance hétérotrophe (*Carlson et Ducklow 1996 ; Carlson et al. 2002*). Dans les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, les données ont révélé une forte corrélation positive entre les concentrations en N et P et le soutien de la croissance des procaryotes hétérotrophes (article II, article III, article IV). La concentration en N et P est restée stable au cours de la transition hiver – été ou variait très ponctuellement. Ces pulses d'apports en N et P enregistrés peuvent suffire à alimenter le réseau trophique qui recycle ensuite les nutriments en permanence.

Outre la limitation par N et P, d'autres facteurs peuvent contrôler la consommation du carbone par les microorganismes hétérotrophes comme l'augmentation de la pression descendante par les brouteurs et les virus, une modification de la labilité biologique de la DOM avec une prédominance de molécules récalcitrantes, empêchant les communautés de procaryote hétérotrophe de l'utiliser à courte échelle temporelle ou encore une combinaison de l'ensemble de ces facteurs.

La prédation des procaryotes hétérotrophes constitue une forte pression de sélection dans le système planctonique (*Sherr et al., 2007 ; Teira et al., 2019 ; Silva et al., 2019*), en particulier dans des conditions extrêmes telles que les systèmes oligotrophes (*Psarra et al., 2005*). Avec la pression de prédation, la lyse virale représente un autre facteur de contrôle descendant important (*Suttle, 2007*). Les virus contrôlent l'abondance microbienne et affectent la structure de la communauté microbienne (*Suttle, 2007 ; Breitbart, 2012*), et leur contribution à la mortalité du bactérioplancton est similaire à celle due aux brouteurs (*Fuhrman et Noble, 1995*). La prédation et la lyse virale peuvent provoquer un changement dans la composition phylogénétique des communautés procaryotes hétérotrophes, avec des conséquences sur le taux de minéralisation de la DOM (*Alonso-Saez et al., 2009*).

Une autre hypothèse possible pour expliquer l'accumulation de DOC enregistrée au cours des suivis est la modification de la labilité biologique de la DOM. De nombreuses études fournissent des preuves que les processus abiotiques (par exemple le photoblanchiment) et biotiques (par exemple la pompe à carbone microbienne) peuvent augmenter la récalcitrance de la DOM et conduire à son accumulation (*Benner et Biddanda 1998 ; Scully et al. 2003 ; Jiao et al. 2010*). Outre ces processus, la labilité de la DOM dépend de sa source. Par exemple, il a été démontré que différentes communautés de phytoplancton peuvent directement libérer de la DOM avec une labilité biologique différente (*Elovaara et al., 2021*).

Mise à part les concentrations en DOC, les autres paramètres chimiques mesurés ne présentaient pas de variations saisonnières nettes, mais plutôt des variations très ponctuelles, souvent

spécifiques à chaque site étudié. Les zones côtières constituent un réceptacle naturel pour les substances dissoutes (*Zabel et Schultz, 2000*). En effet, dans ces zones, les substances dissoutes proviennent de trois sources majeures : les sources autochtones liées principalement à la production primaire dans la colonne d'eau, les apports allochtones qui proviennent de la matière organique du sol et de la dégradation des plantes terrestres (*McKnight et Aiken, 1998 ; Mostofa et al., 2013*) et les sources anthropiques (*Pernet-Coudrier et al., 2008 ; Mostofa et al., 2010*). Les variations temporelles ponctuelles enregistrées lors des suivis peuvent provenir de ces apports continentaux et/ou anthropiques. Les variations ponctuelles de salinité enregistrées dans ces travaux soutiennent l'hypothèse d'apports d'eau douce liés au ruissellement d'eau de pluie par exemple chargée en substances dissoutes.

Ces travaux ont également permis de montrer que les variations temporelles ponctuelles sont plus fréquentes et ont généralement une plus grande amplitude dans les sites impactés par les activités humaines et sous plus grande influence continentale (article II, chapitre III). Cette étude a permis de mettre en évidence une forte variabilité temporelle à différentes échelles à laquelle ces influences locales viendraient se superposer.

VI.2.2. Variations spatiales

Il est difficile de distinguer les influences continentales et humaines, cependant, ces travaux de thèse ont montré que dans les zones sous forte influence anthropique comme la zone portuaire de Toulon (article I, II, chapitre III et article III, chapitre IV) et la baie du Lazaret (article IV, chapitre V), les concentrations en DOC et en nutriments inorganiques étaient presque toujours plus élevées par rapport à une zone côtière plus ouverte sur le large comme la grande rade de Toulon ou la baie du Niel. Les sites impactés par les activités humaines sont situés au cœur d'une grande agglomération, la présence de quelques variations ponctuelles de salinité suggère que ces zones reçoivent des apports de faible volume avec des substances très concentrées pouvant provenir du ruissellement urbain, des eaux usées rejetées par les navires dans le port ou des fuites de réseau d'eaux usées par exemple. Lorsqu'aucune différence de salinité n'est visible, il est également possible que les modifications des propriétés de substances dissoutes observées soient dues à la remise en suspension de sédiment lors de manœuvre de bateau par exemple. Les quelques augmentations de concentration en matière en suspension enregistrées sur les sites sous forte influence anthropique soutiennent cette hypothèse. De plus, les zones d'étude sont des zones portuaires ou des baies très enclavées donc l'effet de ces différents apports peut être accentué par une augmentation du temps de séjour de la masse d'eau. Ainsi,

ces zones sous fortes pressions anthropiques sont, en plus des apports continentaux, sujettes aux apports liés aux activités humaines qui peuvent être une source importante de substances dissoutes. Ces apports anthropiques pourraient être à l'origine des augmentations de la concentration en nutriments inorganiques et en DOC enregistrées dans la zone portuaire.

Il convient de garder à l'esprit que l'influence des activités humaines sur les concentrations en DOC, en N et en P n'est pas constante. En effet, l'écart des concentrations entre les sites impactés et non-impactés varie de manière aléatoire sans tendance claire. Par exemple, le suivi temporel (article II, chapitre III) a montré des pics de concentration à certaines dates spécifiques. L'étude réalisée en mai 2022 a montré un écart de concentration en DOC important entre une baie fortement urbanisée et une zone plus ouverte sur le large (article IV, chapitre V) tandis que l'étude réalisée en mai 2021 (article III, chapitre IV) ne montrait aucune différence de concentration en DOC entre les sites impacté et non-impacté.

Ces observations témoignent des contrastes physico-chimiques importants de l'eau présente dans un site plus ou moins soumis aux pressions anthropiques et suggèrent de multiples influences humaines directes et indirectes sur les propriétés de la MO et d'autres substances dissoutes. Ces travaux de thèse ont permis de montrer dans quelle mesure les activités humaines regroupées au sein et autour d'un port méditerranéen français peuvent modifier la quantité et la qualité des substances dissoutes. Toutefois, il est impossible d'affirmer avec certitude que les activités humaines sont les seules responsables des modifications observées car chaque zone d'étude était alimentée par son propre bassin versant, ce qui ne permet pas d'exclure l'influence des apports continentaux sur les propriétés des substances dissoutes.

VI.2.3. Les sédiments, une source potentielle de nutriments

Dans ces travaux de thèse, une des sources potentielles des variabilités spatiales de propriétés de la DOM et des autres substances nutritives dissoutes a été étudiée. Comme évoqué ci-dessus, la remise en suspension des sédiments est un processus naturel dans le milieu océanique et d'autant plus fréquent dans les zones côtières.

Les sédiments sont connus pour accumuler de nombreuses substances (*Elbaz-Poulichet et al., 2011*) qui peuvent être piégées et modifiées sur des échelles de temps variables ou redistribuées dans la colonne d'eau par différents mécanismes comme la remise en suspension, les réactions chimiques (dissolution, désorption, précipitation) et la diffusion. Ainsi, les substances accumulées dans les sédiments peuvent ne pas être séquestrées de façon permanente, mais peuvent potentiellement être relarguées dans la colonne d'eau (*Dang et al., 2015 ; Coclet et al.,*

2019). Ces apports par les sédiments sont des processus naturels qui se produisent partout dans le milieu marin et qui contribuent au fonctionnement du système (*Vangriesheim et Khripounoff, 1990*). Cependant, l'augmentation de l'occurrence de ce phénomène par les activités anthropiques et la plus forte contamination des sédiments peut constituer une menace pour la qualité de l'eau et les écosystèmes aquatiques. En effet, les activités anthropiques comme les manœuvres de bateaux, le chalutage ou les opérations de dragage peuvent conduire à une remise en suspension des sédiments. La faible profondeur de la colonne d'eau dans les zones côtières favorise ces processus de remise en suspension. Les substances stockées dans les sédiments peuvent ainsi être remises en suspension dans la colonne d'eau et modifier la composition de l'eau et indirectement les processus biogéochimiques.

De nombreuses études ont étudié l'influence de la remise en suspension sur les apports en contaminants inorganiques ou organiques. Dans la rade Toulon, par exemple, il a été démontré que les sédiments étaient chargés en contaminants organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, méthylmercure, tributylétain) (*Misson et al., 2016 ; Wafo et al., 2016 ; Guigue et al., 2017*) et inorganiques (cuivre, plomb, cadmium) (*Tessier et al., 2011 ; Dang et al., 2015*). Certaines études ont démontré que la remise en suspension des sédiments de la rade de Toulon entraînait un apport en éléments traces métalliques dans la colonne d'eau (*Dang et al., 2015 ; Coclet et al., 2019*). Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude faisant état de l'influence de la colonne sédimentaire et plus particulièrement de sa resuspension sur les apports de ressources nutritives dans la rade de Toulon. Ces travaux de thèse ont ainsi permis d'apporter un volet supplémentaire sur les ressources nutritives et leur soutien à la croissance des procaryotes hétérotrophes, à travers deux études.

L'influence de la colonne sédimentaire est difficile à tracer *in situ*. Dans ces travaux, l'utilisation de traceurs géochimiques, et en particulier des isotopes radioactifs naturels du radium (Ra) a permis de mettre en évidence une plus forte influence de la colonne sédimentaire dans la baie du Lazaret fortement anthropisée comparé à une zone plus ouverte sur le large (article IV, chapitre V). Les corrélations entre les concentrations en radium et les paramètres chimiques mesurés ont suggéré que les sédiments étaient à l'origine d'une libération de phosphore inorganique dissous (DIP), d'azote organique dissous (DON) et d'une modification de la composition fluorescente de la DOM. Ces résultats ont été confirmés par la simulation de la remise en suspension de sédiment réalisée en laboratoire (article V, chapitre V). Ces données sont en accord avec d'autres études qui ont également constaté une libération de N et de P (*Qin et al., 2004 ; Takasu et al., 2020 ; Wu et al., 2020*) et une libération de DOM de type humique à la suite d'une remise en suspension des sédiments (*Harfmann et al., 2021*). Toutefois, dans

ces travaux de thèse, les apports sédimentaires semblaient dépendre des propriétés des sédiments utilisés et du temps de resuspension. En effet, les sédiments sableux, à l'inverse des sédiments vaseux, n'ont pas entraîné de libération de DON, ni de modification de la composition de la fraction fluorescente de la DOM. Une libération significative de DOM de type humique a été enregistrée uniquement après 14 jours de remise en suspension pour les sédiments vaseux anciens. De plus, Takasu et al. (2020) ont également montré que la fraction fluorescente de la DOM n'a subi aucun changement suite à la remise en suspension de sédiment vaseux d'un estuaire lors d'un épisode de marée. Ces différences démontrent la grande hétérogénéité d'effets pouvant intervenir à très petite échelle géographique.

Notre étude converge avec la littérature pour démontrer que les zones côtières sont sujettes aux apports par la colonne sédimentaire qui modifient les propriétés des substances dissoutes. Cependant, l'influence des sédiments re-suspendus sur les substances dissoutes semble très irrégulière.

VI.2.4. Perspectives pour mieux comprendre la variabilité spatio-temporelle des facteurs abiotiques

L'étude des variabilités spatio-temporelles des facteurs abiotiques dans ces travaux de thèse a été réalisée à partir d'échantillons issus de prélèvements ponctuels ou issus d'un suivi à fréquence bimensuelle (toutes les 2-3 semaines) sur 7 mois au plus. Ces travaux ont permis une large vision des variations temporelles et spatiales. Cependant pour avoir une vision plus fine et comprendre l'origine de ces modifications observées, il serait intéressant de réaliser une nouvelle campagne d'échantillonnage à plusieurs échelles spatio-temporelles afin de maximiser les contrastes étudiés et suivre finement différents processus pouvant faire varier la qualité biogéochimique du milieu. Cette campagne d'échantillonnage pourrait être réalisée sur une période d'un an couvrant ainsi toutes les saisons à différentes fréquences selon l'objectif souhaité.

Dans un premier temps, la variabilité naturelle saisonnière pourrait être évaluée grâce à des prélèvements à fréquence mensuelle. Les paramètres physico-chimiques classiques en océanographie déjà étudiés au cours de ce travail de thèse (température, oxygène dissous, salinité, pH, matière en suspension, concentration en nutriments) seront mesurés. En plus, une caractérisation plus fine de la DOM au niveau moléculaire permettrait également de documenter les changements saisonniers dans la composition de la DOM.

Afin de mieux caractériser l'influence des activités humaines sur les propriétés des substances dissoutes et la qualité de l'eau, deux approches pourraient être envisagées. Dans un premier temps, l'influence de la fréquentation touristique serait évaluée grâce à des prélèvements bimensuels entre avril et octobre afin de comprendre plus précisément l'impact des activités humaines par rapport aux apports continentaux naturels rencontrés dans les zones côtières. Pour cela, le suivi pourrait être réalisé sur plusieurs sites présentant des niveaux de pression anthropique contrastés afin d'étudier les potentielles différences engendrées par les activités humaines. Des analyses physiques et chimiques permettraient de tracer des contaminants spécifiques et d'évaluer les modifications de la qualité de l'eau. Des analyses chimiques pourraient être réalisées pour documenter les variations des concentrations en substances nutritives (azote, phosphore et carbone), de la composition de la DOM fluorescente mais également les contaminations chimiques en substances toxiques (métaux traces et hydrocarbures). Dans un second temps, l'influence des apports urbains lors d'évènements pluvieux et du renouvellement rapide de la masse d'eau en cas de fort coup de vent, sources de dégradation ou d'amélioration transitoire de la qualité de la masse d'eau, pourrait être suivie à une échelle temporelle plus fine (10 prélèvements sur environ une semaine pour chaque évènement). En plus des analyses chimiques, l'installation *in situ* de capteurs de température, salinité et luminosité pendant le suivi pourrait être envisagée afin de documenter le plus précisément possible la temporalité des changements de masse d'eau induits lors d'épisodes pluvieux (ruissellement urbain et baisse de salinité) et venteux (renouvellement de la masse d'eau par upwelling et baisse de température).

VI.3. La qualité de la DOM est un bon indicateur de sa biodisponibilité en milieu côtier Méditerranéen

Bien que les facteurs chimiques soient importants, leur évaluation seule ne fournit pas une estimation précise de leur influence sur la base hétérotrophe du réseau trophique planctonique. Pour évaluer les conséquences écologiques de cette variabilité complexe sur les communautés de procaryotes hétérotrophes, des expériences d'incubation en laboratoire utilisant des pools de substances dissoutes naturelles et des communautés microbiennes naturelles ont été réalisées. L'objectif de ces expériences était de comprendre l'influence des variations spatio-temporelles des substances dissoutes sur la croissance des procaryotes hétérotrophes et d'estimer la biodisponibilité de la DOM.

La biodisponibilité de la DOM pour les microorganismes hétérotrophes dépend de nombreux facteurs tels que la quantité et la qualité de la matière organique. Plus précisément, la biodisponibilité de la DOM semble dépendre des rapports DOC/DON du substrat (*Kroer, 1993*) et du poids moléculaire du substrat (*Tulonen et al., 1992 ; Amon et Benner, 1996*). Il a été démontré que la quantité de DOM, en tant que substrat pour les hétérotrophes, n'affecte sa biodisponibilité qu'à de très faibles concentrations (*Eiler et al., 2003*), alors que la qualité de la DOM a une plus forte influence sur sa biodisponibilité (*Kroer, 1993*). Hopkinson et al. (*1998*) ont ainsi évalué que les variations de qualité de la DOM peuvent expliquer jusqu'à 75% de la variabilité de la croissance bactérienne. La biodisponibilité de la DOM semble également positivement corrélée à la disponibilité en nutriments inorganiques (*Tulonen et al., 1992 ; Kroer, 1993 ; Zweifel et al., 1993*). Par conséquent, de nombreux processus sont susceptibles de gouverner la biodisponibilité de la DOM pour les procaryotes hétérotrophes et ces processus peuvent eux-mêmes répondre à différents facteurs de contrôle (*Del Giorgio et Cole, 1998*). En effet, l'utilisation de la DOM par les communautés de procaryotes hétérotrophes dépend également de la variabilité de leurs besoins énergétiques. De plus, la régulation de la croissance des procaryotes hétérotrophes par les prédateurs et les virus peuvent interférer avec notre capacité à mesurer la biodisponibilité de la DOM. L'étude de la biodisponibilité de la DOM nécessite donc la mise en place d'approches expérimentales prenant en compte l'ensemble de ces paramètres afin d'obtenir une évaluation précise et correcte.

Durant ces travaux de thèse, le lien entre les propriétés des substances dissoutes, la biodisponibilité de la DOM et la croissance des procaryotes hétérotrophes a été étudié en réalisant des expériences d'incubation en laboratoire. Ces dernières consistaient à exposer des substances dissoutes de zones côtières contrastées avec une communauté de procaryotes hétérotrophes. Ces expériences ont été réalisées plusieurs fois au cours de cette thèse. Elles ont permis dans un premier temps de comprendre l'influence des substances dissoutes sur la croissance des procaryotes hétérotrophes (article I, II, chapitre III ; article IV, chapitre V). Dans un second temps, elles ont permis d'estimer la biodisponibilité de la DOM en couplant l'étude de la croissance des procaryotes hétérotrophes et l'estimation de la consommation des substances dissoutes (article III, chapitre IV ; article V, chapitre V).

Dans l'ensemble de ces expériences, la croissance des procaryotes hétérotrophes la plus forte a toujours été observée lorsqu'elles se développaient avec une DOM provenant d'une grande zone portuaire. Dans la majorité de ces expériences d'incubation réalisées, cette stimulation de croissance microbienne correspondait à une différence de composition de la DOM (article II, chapitre III ; article III, chapitre IV ; articles IV, chapitre V). En effet, l'étude des composés

fluorescents de la DOM par spectroscopie de fluorescence a révélé une qualité différente entre une zone portuaire et une zone ouverte sur le large. Globalement, les proportions des composés de type humique terrestre, humique marin et tryptophane étaient plus fortes dans la zone portuaire. Les composés de type humique marin sont souvent associés aux produits de dégradation des exsudats du phytoplancton, témoignant d'une activité hétérotrophe importante dans la colonne d'eau (*Parlanti et al., 2002 ; Nieto-Cid et al., 2005 ; Stedmon et Markager, 2005 ; Romera-Castillo et al., 2010*). D'autres études ont démontré la présence de ce fluorophore également dans les eaux douces (*Huguet et al., 2010*) et les rejets de station d'épuration des eaux usées (*Yamashita et Tanoue, 2003 ; Stedmon et al., 2007*). Stedmon et al. (2005) associent ce fluorophore à une DOM altérée par une activité microbienne récente. Il est largement admis que la proportion de composant protéique (tyrosine et tryptophane) dans la FDOM est une indication de la présence et de la proportion de carbone organique dissous labile (*Hudson et al., 2008 ; Fellman et al., 2009a, b ; Hood et al., 2009*). Ainsi, le signal fluorescent de type protéine a été suggéré comme traceur approprié des composés labiles (*Yamashita et Tanoue, 2003 ; Lønborg et al., 2010*). L'intensité de ces fluorophores est dépendante de l'état de dégradation du matériel organique (*Determann et al., 1998*). La fluorescence des composés de type humique terrestre est associée au matériel végétal terrestre décomposé (*McKnight et Aiken, 1998*). Selon l'état de décomposition de ces substances, elles peuvent être qualifiées comme des composés labiles pour les communautés hétérotrophes (*Crump et al., 2003*). L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une zone portuaire est elle-même une source de DOM pour l'environnement côtier, fraîche ou modifiée et qui peut soutenir la croissance hétérotrophe et augmenter la capacité de charge du système.

Un autre moyen d'évaluer la biodisponibilité de la DOM consiste à ne pas seulement évaluer la qualité de la DOM présente, mais le type de composés consommés par les procaryotes hétérotrophes. Ainsi, pour comparer la biodisponibilité de la DOM issue d'une zone portuaire et d'une zone ouverte sujette à des apports plus naturels, les consommations des composés de la DOM ont été suivies au cours des expériences d'incubation (article III, chapitre IV ; articles IV et V, chapitre V). La consommation plus élevée des trois composants fluorescents de type humique marin, humique terrestre et tryptophane dans les conditions avec des substances dissoutes issues d'une zone sous forte pression anthropique, correspondait à une croissance nette plus élevée de la communauté microbienne. Cette observation répétée soutient l'hypothèse d'une contribution importante de la qualité de la DOM dans sa biodisponibilité et son devenir (*Del Giorgio et Cole, 1998 ; Kowalczyk et al., 2013 ; Shen et Benner, 2020*). Pour aller plus loin dans cette analyse qualitative de la DOM, sa composition élémentaire et moléculaire a été

étudiée au cours d'une des expériences d'incubation (article III, chapitre IV). La caractérisation moléculaire réalisée par Orbitrap a montré que la composition de la DOM était différente entre un site impacté par les activités humaines et un site côtier plus ouvert sur le large. Un enrichissement de composés dit labiles comme les protéines, sucres aminés et glucides a été observé dans la zone sous forte pression anthropique tandis que la DOM du site côtier ouvert sur le large était préférentiellement constituée de lignine, qualifiée de composés plus réfractaires. L'étude de la composition moléculaire de la DOM couplée avec l'étude de la croissance bactérienne a montré un contrôle majeur de la composition de la DOM sur sa biodisponibilité. Les variations de composition moléculaire de la DOM ont conduit à des différences de consommation et de production de biomasse. En effet, l'enrichissement des composés organiques labiles (protéines, acides aminés et glucides) et leur consommation correspondait à une croissance plus élevée des procaryotes hétérotrophes. La disponibilité de ces familles moléculaires, plus que la disponibilité globale du DOM, semblait déterminer les capacités de croissance des procaryotes hétérotrophes ainsi que la biodisponibilité de la DOM et son devenir.

VI.4. La quantité de nutriments influence les capacités de prise en charge de la DOM par les microorganismes dans une zone côtière méditerranéenne

VI.4.1. Disponibilité en azote et en phosphore

L'azote et le phosphore organiques et inorganiques sont des composés utilisables par les bactéries. En milieu marin hauturier, ces composés varient de manière saisonnière à cause de leur consommation par les microorganismes (*Kirchman, 1994*) d'une part, et des processus de mélange de la colonne d'eau d'autre part (*Cullen, 1991*). En milieu côtier, les apports continentaux peuvent également entraîner d'importantes variations ponctuelles de la concentration de ces nutriments. À certaines périodes, les concentrations naturelles de ces composés peuvent varier du micro- au nano-molaire approchant les limites de détection des instruments analytiques (*Céa et al., 2015*) et devenant alors limitantes pour la croissance bactérienne. Selon la situation géographique, les éléments limitants ne sont pas les mêmes. D'après les résultats obtenus à partir d'expériences d'enrichissement réalisées principalement pendant la période estivale, le phosphore est apparu être le principal élément limitant en mer Méditerranée (*Thingstad et Rassoulzadegan, 1995 ; Cotner et al., 1997 ; Thingstad et al.,*

1998 ; *Torréton et al., 2000 ; Van Wambeke et al., 2002, 2008 ; Obenosterer et al., 2003*). La limitation par le phosphore semble plus commune chez les bactéries que la limitation par l'azote. Cette observation s'explique par le fait que dans les cellules bactériennes, l'azote se présente principalement sous forme de protéines qui ne sont généralement pas dégradées, mais synthétisées séparément de la croissance bactérienne (faible « *Turn Over* »). Le phosphore dans les cellules bactériennes se retrouve quant à lui principalement sous forme d'acides nucléiques, de lipides et de nucléotides qui se renouvellent rapidement (fort « *Turn Over* ») (*Kirchman, 2012*). Cependant, certaines études ont également rapporté des preuves de limitation par l'azote (*Torréton et al., 2000*).

Dans ces travaux de thèse, les résultats obtenus ont soulevé quelques questions intrigantes sur le rôle des nutriments pour la prise en charge de la DOM. Dans un premier temps, la plus forte croissance des procaryotes hétérotrophes enregistrée dans l'ensemble des études réalisées était corrélée positivement aux concentrations en nutriments organiques et/ou inorganiques. Lorsqu'elle a été mesurée, la consommation de nutriments organiques et/ou inorganiques était aussi plus élevée lorsque la croissance des procaryotes hétérotrophes était plus forte. Cependant, aucune distinction claire n'a été mise en évidence entre l'utilisation de nutriments inorganiques ou organiques pour la croissance. En effet, au cours du suivi temporel (article II, chapitre III), la croissance des procaryotes hétérotrophes a été corrélée positivement aux concentrations des formes inorganiques de l'azote et du phosphore (DIN et DIP). Lors du suivi cinétique de la biodégradation de la DOM (article III, chapitre IV) et de l'étude de l'influence de la colonne sédimentaire (article IV, chapitre V), la croissance était soutenue par une plus forte consommation de DIN et DOP ou de DON et DIP, respectivement. La forme que les procaryotes hétérotrophes utilisent dans les expériences d'incubation peut être déterminée par la disponibilité initiale des nutriments. Celle-ci peut dépendre de nombreux processus comme la production primaire, les apports continentaux ou la compétition entre le phytoplancton et les procaryotes hétérotrophes, par exemple qui peuvent varier dans le temps et dans l'espace. Il a été démontré depuis de nombreuses années que la compétition entre les microorganismes autotrophes et hétérotrophes peut être importante dans le milieu (*Joins et Morris, 1982*) et que dans des conditions de limitation par les nutriments inorganiques, les bactéries hétérotrophes peuvent entrer en compétition avec le phytoplancton pour les nutriments inorganiques. Ainsi, les procaryotes hétérotrophes peuvent indirectement limiter la production primaire en privant le phytoplancton de nutriments. La limitation de l'activité phytoplanctonique entraîne également une diminution de la production de DOM et donc de nutriments organiques disponibles pour les hétérotrophes. Cependant, la disponibilité des nutriments est plus complexe

car la biomasse des procaryotes hétérotrophes est contrôlée par la prédation par des protistes (*Shiah et Duclow, 1994 ; Thingstad et Lignell, 1997*), ce qui permet de réguler la compétition avec le phytoplancton et peut donc entraîner une amélioration de la production primaire (*Brussaard et Riegman, 1998*). Ces interactions peuvent donc réguler la composition chimique initiale de l'eau de mer et donc modifier la forme disponible des nutriments à un temps et un lieu donné et pourraient ainsi expliquer pourquoi l'utilisation de composés organiques ou inorganiques ne concorde pas entre les différentes expériences.

VI.4.2. Perspectives pour évaluer l'influence respective de l'azote et du phosphore

À l'issue des résultats obtenus dans ces travaux de thèse, une perspective intéressante serait de hiérarchiser les influences de l'azote et du phosphore sur la prise en charge de la DOM par les procaryotes hétérotrophes. Pour mieux comprendre ces processus de limitation par les nutriments, des expériences d'enrichissement dans des incubations aux conditions contrôlées sont fréquemment utilisées et pourraient être envisagées comme perspective. Les avantages de ces incubations sont désormais largement reconnus ; ils offrent une opportunité de contraindre un assemblage planctonique, minimisant les pertes dispersives et permettant des manipulations en ajoutant des nutriments (*e.g. Hein et Riemann 1995 ; Egge, 1998 ; Sondergaard et al., 2000*) ou des polluants (*Gustavson et al., 1999*).

L'approche expérimentale pourrait consister à incuber une même communauté de procaryotes hétérotrophes (afin de s'affranchir de l'influence de la structure et du potentiel fonctionnel de la communauté) avec des substances dissoutes issues de sites contrastés enrichis en azote ou en phosphore inorganique ou les deux en combinaison. Cela implique une mesure initiale des concentrations totales en azote et phosphore qui permettra d'adapter les ajouts pour avoir la même concentration totale dans toutes les conditions. Les concentrations en azote et en phosphore pourraient être fixées par exemple à 2 fois la concentration la plus forte enregistrée au cours du suivi temporel (article II, chapitre III). Une condition contrôle sans ajout servira de condition témoin. L'enjeu de ces expériences est de résoudre les questions autour de la covariation de la qualité de la DOM et la disponibilité en azote et en phosphore. L'objectif de cette approche serait de comprendre si la disponibilité de la DOM pour les procaryotes hétérotrophes dépend seulement de la différence de disponibilité en azote et en phosphore ou une combinaison entre la qualité de la DOM et la disponibilité des ressources nutritives.

VI.5. La structure de la communauté et le devenir du carbone

VI.5.1. Est-ce la disponibilité en substances nutritives dissoutes ou la contamination métallique qui façonne les communautés dans les zones côtières ?

Dans le milieu naturel, la DOM varie en qualité et en quantité dans l'espace et le temps (*Kothawala et al., 2014*), variations auxquelles les microorganismes doivent s'adapter. Malgré une variation importante et complexe des paramètres physico-chimiques, l'abondance moyenne des procaryotes hétérotrophes dans l'océan est remarquablement stable. Dans les régions océaniques et côtières, il s'agit généralement d'environ 10^5 et 10^6 cellules.mL⁻¹, respectivement (*Whitman et al., 1998*). La prédation contrôle cette moyenne puisque les bactéries, les virus et les protozoaires possèdent des taux de reproduction comparables. Les campagnes de terrains réalisées durant cette thèse ont montré que l'abondance des communautés de procaryotes hétérotrophes était similaire entre la zone portuaire et la zone ouverte sur le large (articles I et II, chapitre III ; article III, chapitre IV ; articles IV et V chapitre V). En revanche, dans l'étude où la composition de la communauté a été étudiée (article III, chapitre IV) une variation de diversité a été observée entre une zone portuaire et une zone côtière ouverte. La diversité de la communauté bactérienne était plus élevée dans la zone ouverte sous faible influence anthropique que dans la zone portuaire sous forte influence anthropique. Dans la même zone d'étude, Coclet et al., (2019) ont observé la même tendance et ont émis l'hypothèse de liens directs et indirects avec la contamination métallique d'origine anthropique.

Coclet et al. (2019) ont associé les Flavobacteriaceae et les Pseudomonadales à une contamination métallique importante tandis que les SAR11 et les Rhodobacteraceae ont été associés à une faible contamination métallique. D'après les résultats de leur étude, le gradient de contamination métallique était un facteur majeur structurant la communauté bactérienne dans la rade de Toulon. La contamination métallique entraînait un changement taxonomique en raison du remplacement des espèces abondantes par des espèces naturellement rares. Ils ont toutefois suggéré que ces espèces sélectionnées dans les zones contaminées étaient des copiotrophes et que la quantité et la qualité des ressources nutritives auraient pu également contribuer à expliquer ces tendances. L'étude réalisée dans ce travail de thèse a confirmé cette hypothèse (article III, chapitre IV). En effet, outre les biais expérimentaux favorisant la sélection de bactéries opportunistes, biais qui seront discutés plus tard dans ce manuscrit, les substances dissoutes disponibles ont modifiées la structure de la communauté initiale. Les substances assimilables de la zone ouverte sous faible influence anthropique ont favorisé le

développement de groupes caractéristiques des zones peu anthropisées (*Fuhrman et Steele, 2008 ; Gilbert et al., 2009, 2012 ; Sunagawa et al., 2015*). Ainsi, le développement des familles associées aux classes Alphaproteobacteria (SAR11 et Rhodobacteraceae) a été favorisé dans les conditions avec les substances dissoutes de la zone côtière ouverte. Les substances dissoutes de la zone sous forte pression anthropique ont quant-à-elles favorisé le développement des taxa associés aux classes Bacteroidota (Flavobacteriaceae) et Gammaproteobacteria (Pseudomonadales). Ces groupes sont généralement retrouvés dans des environnements perturbés (*Sun et al., 2013 ; Ni et al., 2016*).

Ces résultats semblent démontrer que la disponibilité en substances nutritives dissoutes est le facteur principal contrôlant la structure de la communauté des procaryotes hétérotrophes. La contamination métallique semble avoir un effet plutôt indirect sur les procaryotes hétérotrophes. En effet, *Coclet et al. (2019)* ont également laissé sous-entendre que la contamination métallique entraînait une mortalité du phytoplancton, libérant ainsi de la matière organique fraîche pouvant stimuler les procaryotes hétérotrophes et influencer la structure de la communauté.

De plus, dans cette thèse, les espèces de procaryotes hétérotrophes sélectionnées en fonction des substances dissoutes disponibles semblaient posséder des fonctionnalités et des capacités métaboliques différentes (article III, chapitre IV). En effet, lors des expériences d'incubation les ressources nutritives ont sélectionné des taxa aux fonctionnalités différentes influençant l'utilisation des différents pools de DOM. D'un point de vue biogéochimique, les plus fortes croissances observées avec la DOM portuaire et les consommations de DOC similaires entre les différentes conditions suggèrent que la DOM de la zone portuaire a été plus facilement convertie en biomasse alors que la DOM de la zone ouverte était principalement utilisée par les communautés microbiennes pour la respiration ou pour des processus de maintenance. Ainsi, les ressources nutritives dissoutes en sélectionnant des taxa aux fonctionnalités différentes peuvent avoir un impact sur le devenir du carbone.

VI.5.2. Perspectives pour mieux comprendre le devenir de la DOM à travers la boucle microbienne

Les procaryotes hétérotrophes contribuent aux cycles de la matière organique à travers la production de nouvelle biomasse bactérienne (production secondaire) et la reminéralisation du carbone organique et des nutriments via la respiration bactérienne (production de CO₂) (*Del Giorgio et Cole, 1998*). Connaître l'équilibre entre absorption et production du CO₂, et ainsi

réaliser un bilan carbone pour décrire la capacité des zones côtières à absorber ce gaz à effet de serre atmosphérique est un enjeu écologique majeur. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'influence des variabilités spatio-temporelles des propriétés des substances dissoutes dans les zones côtières sur la croissance des procaryotes hétérotrophes. La stimulation de la croissance bactérienne par les propriétés des substances dissoutes issues des zones sous forte pression anthropique ouvre des questions intrigantes sur l'effet de l'anthropisation sur la respiration bactérienne et donc sur l'équilibre entre puits et source de CO₂ des océans. Cependant, la respiration bactérienne n'a pas pu être étudiée dans ce travail à cause des contraintes et des limites des techniques. C'est une approche méthodologique qui mériterait d'être approfondie.

La respiration est le plus souvent estimée en mesurant les changements d'oxygène dissous (O₂) au cours des incubations *in situ* ou en laboratoire. L'approche expérimentale qui pourrait être envisagée consisterait à incuber des substances dissoutes sous influence anthropique contrastée avec une communauté de procaryotes hétérotrophes naturelle et à suivre la concentration d'oxygène dissous sur un temps d'incubation définis. Le taux de respiration dans les zones oligotrophes est souvent très faible, ce qui rend les changements d'O₂ difficiles à estimer au cours des incubations à court terme (quelques heures). Par conséquent, les échantillons sont généralement incubés pendant 24 heures ou plus.

La concentration en oxygène peut être surveillée en continu à l'aide de différentes techniques telles que les respiromètres à microélectrodes de Clark, qui ont été développés au cours des dernières années (*Langdon, 1993*). L'utilisation de microélectrodes de Clark pour mesurer la respiration bactérienne peut résoudre l'un des principaux problèmes rencontré avec les mesures discrètes : le suivi de la diminution de l'oxygène lors des incubations. Cette surveillance permet de suivre la concentration en oxygène en fonction du temps. Il est également possible de détecter le début d'une consommation importante d'oxygène et permet ainsi d'adapter le temps d'incubation. Une expérience test a été réalisée au cours de cette thèse avec les microélectrodes de Clark afin de mesurer la respiration bactérienne. Cependant, plusieurs problèmes ont été rencontrés. La mesure d'oxygène avec les microélectrodes nécessitait l'utilisation de fiole en verre de très faible volume qui a engendré un *bottle effect* important et a donc remis en question les résultats de cette expérience. De plus, les diminutions d'oxygène due à une consommation par les procaryotes hétérotrophes étaient très faibles et la précision des microsondes à oxygène n'était pas suffisante pour mesurer cette consommation.

Munson-McGee et al. (2022) ont proposé une méthode alternative pour estimer le taux de respiration microbienne. Ils ont utilisé le RedoxSensor Green (RSG) en combinaison à la

cytométrie en flux pour estimer des taux de respiration de l'oxygène. Cette approche consiste à suivre l'activité spécifique de l'oxydoréductase qui convertit le RSG en un produit fluorescent vert à l'intérieur des cellules vivantes qui peut être quantifié par microscopie ou cytométrie. L'approche RSG peut permettre des mesures de respiration microbienne dans des environnements de faible biomasse et/ou de faible activité dans lesquels les méthodes actuelles manquent de sensibilité. Cette approche mesure de manière unique la respiration à l'échelle de cellules individuelles et de manière non destructive, ce qui offre des possibilités d'étudier la variabilité de la respiration et de la combiner avec d'autres analyses des mêmes cellules.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiken, G. (2014). Fluorescence and dissolved organic matter: a chemist's perspective. *Aquatic organic matter fluorescence*, 35, 35.
- Aller, R. C. (1994). Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology*, 114(3-4), 331-345. DOI: 10.1016/0009-2541(94)90062-0
- Allers, E., Gómez-Consarnau, L., Pinhassi, J., Gasol, J. M., Šimek, K. & Pernthaler, J. (2007). Response of Alteromonadaceae and Rhodobacteriaceae to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2417–242. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01360.x
- Alonso-Sáez, L., Unanue, M., Latatu, A., Azua, I., Ayo, B., Artolozaga, I., & Iriberry, J. (2009). Changes in marine prokaryotic community induced by varying types of dissolved organic matter and subsequent grazing pressure. *Journal of plankton research*, 31(11), 1373-1383. DOI: 10.1093/plankt/fbp081
- Ammerman, J. W., Fuhrman, J. A., Hagström, A., & Azam, F. (1984). Bacterioplankton growth in seawater: I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 18(1), 31-39.
- Amon, R. M., & Benner, R. (1996). Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 41(1), 41-51. DOI: 10.4319/lo.1996.41.1.0041
- Amon, R. M. W., & Benner, R. (2001). Linkages among the bioreactivity, chemical composition, and diagenetic state of marine dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.*, 46, 287–297. DOI: 10.4319/lo.2001.46.2.0287
- Anderson, M. R., & Rivkin, R. B. (2001). Seasonal patterns in grazing mortality of bacterioplankton in polar oceans: a bipolar comparison. *Aquatic Microbial Ecology*, 25(2), 195-206. DOI: 10.3354/ame025195

- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., & Cerda, V. (2013). Environmental applications of excitation-emission spectrofluorimetry: an in-depth review I. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(1), 1-49. DOI: 10.1080/05704928.2012.692104
- Arístegui, J., Gasol, J. M., Duarte, C. M., & Herndl, G. J. (2009). Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnology and Oceanography*, 54(5), 1501-1529. DOI: 10.4319/lo.2009.54.5.1501
- Arnal, O., Sauzade, D., Console, J. J., Miralles, F., Chavanon, F., Ravel, C., Emery, E., & Beliaeff, B. (2001). Study of microbiological quality of Lazaret Bay (Toulon Bay). Convention n° 00/3210048/YF between SIAT and Ifremer (in French)
- Arrieta, J. M., Mayol, E., Hansman, R. L., Herndl, G. J., Dittmar, T., & Duarte, C. M. (2015). Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science*, 348, 331–333. DOI: 10.1126/science.1258955
- Artifon, V., Zanardi-Lamardo, E., Fillmann, G. (2019). Aquatic organic matter: Classification and interaction with organic microcontaminants. *Science of the Total Environment*, 649, 1620–1635
- Arzayus, K. M., & Canuel, E. A. (2005). Organic matter degradation in sediments of the York River estuary: Effects of biological vs. physical mixing. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(2), 455-464. DOI: 10.1016/j.gca.2004.06.029
- Asmala, E., Autio, R., Kaartokallio, H., Pitkänen, L., Stedmon, C. A., & Thomas, D. N. (2013). Bioavailability of riverine dissolved organic matter in three Baltic Sea estuaries and the effect of catchment land use. *Biogeosciences*, 10(11), 6969-6986. DOI: 10.5194/bg-10-6969-2013
- Avril, B. (2002). DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED site). Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 49(11), 2163-2182. DOI: 10.1016/S0967-0645(02)00033-4
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10, 257-263. DOI: 10.3354/meps010257

- Azam, F., & Cho, B. C. (1987). Bacterial utilization of organic matter in the sea. In: SGM41, Ecology of Microbial Communities. Cambridge University Press, Cambridge, 261-281.
- Azam, F., Smith, D. C., Steward, G. F. et al. (1994). Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb. Ecol.*, 28, 167–179. DOI: 10.1007/BF00166806
- Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science*, 280, 694–696. DOI: 10.1126/science.280.5364.694
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782-791. DOI: 10.1038/nrmicro1747
- Bachi, G. (2022). Interactions between Dissolved Organic Matter and microorganisms: implications for the global carbon cycle.
- Bachi, G., Morelli, E., Gonnelli, M., Balestra, C., Casotti, R., Evangelista, V., ... & Santinelli, C. (2023). Fluorescent properties of marine phytoplankton exudates and lability to marine heterotrophic prokaryotes degradation. *Limnology and Oceanography*, 68(4), 982-1000. DOI: 10.1002/lno.12325
- Baghoth, S. A., Sharma, S. K., & Amy, G. L. (2011). Tracking natural organic matter (NOM) in a drinking water treatment plant using fluorescence excitation–emission matrices and PARAFAC. *Water research*, 45(2), 797-809. DOI: 10.1016/j.watres.2010.09.005
- Baker, A., & Spencer, R. G. (2004). Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the total environment*, 333(1-3), 217-232. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.04.013
- Baker, A., Hudson, N., Spencer, R. G. M., & Bridgeman, J. (2007). Spectrophotometric Characterization of freshwater dissolved organic matter. In 2nd Developments in Water Treatment Conference.
- Barrera-Alba, J. J., Gianesella, S. M. F., Moser, G. A. O., & Saldanha-Corrêa, F. M. P. (2009). Influence of allochthonous organic matter on bacterioplankton biomass and activity in a eutrophic, sub-tropical estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82(1), 84-94. DOI: 10.1016/j.ecss.2008.12.020

- Barrera-Alba, J. J., Abreu, P. C., & Tenenbaum, D. R. (2019). Seasonal and inter-annual variability in phytoplankton over a 22-year period in a tropical coastal region in the southwestern Atlantic Ocean. *Continental Shelf Research*, 176, 51-63. DOI: 10.1016/j.csr.2019.02.011
- Bauer, J. E., & Bianchi, T. S. (2011). Dissolved Organic Carbon Cycling and Transformation. In: Wolanski E and McLusky DS (eds.) *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, Vol 5, pp. 7–67. Waltham: Academic Press.
- Baturin, G. N. (2003). Phosphorus cycle in the ocean. *Lithology and Mineral Resources*, 38, 101-119. DOI: 10.1023/A:1023499908601
- Beck, M., Böning, P., Schückel, U., Stiehl, T., Schnetger, B., Rullkötter, J., & Brumsack, H. J. (2013). Consistent assessment of trace metal contamination in surface sediments and suspended particulate matter: A case study from the Jade Bay in NW Germany. *Marine pollution bulletin*, 70(1-2), 100-111. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.02.017
- Beck, O., Rylski, A., & Stephanson, N. N. (2019). Application of liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry for urine drug testing. In *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing* (pp. 321-332). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-815607-0.00023-X
- Beman, J. M., Steele, J. A., & Fuhrman, J. A. (2011). Co-occurrence patterns for abundant marine archaeal and bacterial lineages in the deep chlorophyll maximum of coastal California. *The ISME journal*, 5(7), 1077-1085. DOI: 10.1038/ismej.2010.204
- Benitez-Nelson, C. R. (2000). The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Reviews*, 51(1-4), 109-135. DOI: 10.1016/S0012-8252(00)00018-0
- Benner, R., & Biddanda, B. (1998). Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: Effects on bacterial growth. *Limnology and Oceanography*, 43(6), 1373-1378. DOI: 10.4319/lo.1998.43.6.1373
- Benner, R. (2002). In *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, Hansell DA, Carlson CA (eds). Academic Press: San Diego, 71–80.

- Benner, R., & Amon, R. M. W. (2015). The Size-Reactivity Continuum of Major Bioelements in the Ocean. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 7, 185–205. DOI: 10.1146/annurev-marine-010213-135126
- Bertilsson, S., & Tranvik, L. J. (2000). Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnology and Oceanography*, 45(4), 753-762. DOI: 10.4319/lo.2000.45.4.0753
- Bertilsson, S., & Jones Jr, J. B. (2003). Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources. In *Aquatic ecosystems* (pp. 3-24). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-012256371-3/50002-0
- Besemer, K., Luef, B., Preiner, S., Eichberger, B., Agis, M., & Peduzzi, P. (2009). Sources and composition of organic matter for bacterial growth in a large European river floodplain system (Danube, Austria). *Org Geochem.*, 40(3), 321–331. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2008.12.005
- Bieroza, M., Baker, A., & Bridgeman, J. (2009). Relating freshwater organic matter fluorescence to organic carbon removal efficiency in drinking water treatment. *Science of the Total Environment*, 407(5), 1765-1774. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.013
- Bieroza, M., Baker, A., & Bridgeman, J. (2012). Exploratory analysis of excitation–emission matrix fluorescence spectra with self-organizing maps—A tutorial. *Education for Chemical Engineers*, 7(1), e22-e31. DOI: 10.1016/j.ece.2011.10.002
- Biers E.J., Sun S., & Howard E.C. (2009). Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome. *American Society for Microbiology Journals*, 75(7), 2221-2229. DOI: 10.1128/AEM.02118-08
- Björkman, K. M., & Karl, D. M. (2003). Bioavailability of dissolved organic phosphorus in the euphotic zone at Station ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Limnology and Oceanography*, 48(3), 1049-1057. DOI: 10.4319/lo.2003.48.3.1049
- Blough, N. V., Zafiriou, O. C., & Bonilla, J. (1993). Optical absorption spectra of waters from the Orinoco River outflow: Terrestrial input of colored organic matter to the Caribbean. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 98(C2), 2271-2278. DOI: 10.1029/92JC02763

- Bogé, G., Lespilette, M., Jamet, D., Jamet, J. L. (2012). Role of sea water DIP and DOP in controlling bulk alkaline phosphatase activity in NW Mediterranean Sea (Toulon, France). *Marine pollution bulletin*, 64(10), 1989-1996. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.07.028
- Borges, A. V., Schiettecatte, L. S., Abril, G., Delille, B., & Gazeau, F. (2006). Carbon dioxide in European coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70(3), 375-387. DOI: 10.1016/j.ecss.2006.05.046
- Borges, A. V. (2011). Present day carbon dioxide fluxes in the coastal ocean and possible feedbacks under global change. *Oceans and the atmospheric carbon content*, 47-77. DOI: 10.1007/978-90-481-9821-4_3
- Borgmann, U., & Munawar, U. M. (1989). A new standardized sediment bioassay protocol using the amphipod *Hyaella azteca* (Saussure). *Hydrobiologia*, 188(1), 425-431. DOI: 10.1007/BF00027810
- Bormann F. H., & Likens G. E. (1967) Nutrient Cycling. *Science*, 155 (3761), pp. 424–429. DOI: 10.1126/science.155.3761.424
- Borum, J., & Sand-Jensen, K. (1996). Is total primary production in shallow coastal marine waters stimulated by nitrogen loading? *Oikos*, 406-410. DOI: 10.2307/3546213
- Boström, K. H., Simu, K., Hagström, Å., & Riemann, L. (2004) Optimization of dna extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 2(11), 365–373. DOI: 10.4319/LOM.2004.2.365.
- Breitbart, M. (2012). Marine viruses: truth or dare. *Annual review of marine science*, 4, 425-448. DOI: 10.1146/annurev-marine-120709-142805
- Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 38(2), 149-171. DOI: 10.1016/S0169-7439(97)00032-4
- Broecker, W. S., & Peng, T. H. (1974). Gas exchange rates between air and sea. *Tellus*, 26(1-2), 21-35. DOI: 10.3402/tellusa.v26i1-2.9733

- Broecker, W. S., Takahashi, T., Simpson, H. J., & Peng, T. H. (1979). Fate of fossil fuel carbon dioxide and the global carbon budget. *Science*, 206(4417), 409-418. DOI: 10.1126/science.206.4417.409
- Brookshire, E. N. J., Valett, H. M., Thomas, S. A., & Webster, J. R. (2005). Coupled cycling of dissolved organic nitrogen and carbon in a forest stream. *Ecology*, 86(9), 2487-2496. DOI: 10.1890/04-1184
- Brussaard, C. P., & Riegman, R. (1998). Influence of bacteria on phytoplankton cell mortality with phosphorus or nitrogen as the algal-growth-limiting nutrient. *Aquatic Microbial Ecology*, 14(3), 271-280. DOI: 10.3354/ame014271
- Buchan, A., LeCleir, G. R., Gulvik, C. A., & González, J. M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, 686–698. DOI: 10.1038/nrmicro3326
- Buffle, J. (1988) Complexation reactions in aquatic system: an analytical approach. Ellis Horwood, New York, p 692.
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A. W., Johnson, A. J. A., Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods*, 13, 581–583. DOI: 10.1038/nmeth.3869
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643. DOI: 0.1038/ismej.2017.119
- Campbell, P. G. C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner DR (eds) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Wiley, Chichester, Grande-Bretagne, pp 45–102.
- Carlson, C. A., Ducklow, H. W., & Michaels, A. F. (1994). Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. *Nature*, 371(6496), 405-408. DOI: 10.1038/371405a0

- Carlson, C. A., & Ducklow, H. W. (1996). Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 10, 69-85. DOI: 10.3354/ame010069
- Carlson, C. A., Hansell, D. A., Peltzer, E. T., & Smith Jr, W. O. (2000). Stocks and dynamics of dissolved and particulate organic matter in the southern Ross Sea, Antarctica. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 47(15-16), 3201-3225. DOI: 10.1016/S0967-0645(00)00065-5
- Carlson, C. A., Giovannoni, S. J., Hansell, D. A., Goldberg, S. J., Parsons, R., Otero, M. P., & Vergin, K. (2002). Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 30, 19–36. DOI: 10.3354/ame030019
- Carlson, C. A., Giovannoni, S. J., Hansell, D. A., Goldberg, S. J., Parsons, R., & Vergin, K. (2004). Interactions among dissolved organic carbon, microbial processes, and community structure in the mesopelagic zone of the northwestern Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography*, 49(4), 1073-1083. DOI: 10.4319/lo.2004.49.4.1073
- Carlson, C. A., Hansell, D. A., Nelson, N. B., Siegel, D. A., Smethie, W. M., Khatiwala, S., ... & Halewood, E. (2010). Dissolved organic carbon export and subsequent remineralization in the mesopelagic and bathypelagic realms of the North Atlantic basin. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(16), 1433-1445. DOI: 10.1016/j.dsr2.2010.02.013
- Carlson, C. A., Hansell, D. A. (2015). Chapter III - DOM Sources, Sinks, Reactivity, and Budgets. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter (Second Edition)*, Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-405940-5.00003-0
- Carstea, E. M. (2012). Fluorescence spectroscopy as a potential tool for in-situ monitoring of dissolved organic matter in surface water systems. *Water Pollution*, 1.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108, 4516-4522. DOI: 10.1073/pnas.1000080107

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621-1624. DOI: 10.1038/ismej.2012.8
- Cauwet, G. (2002). DOM in the coastal zone. *Biogeochem. Mar. Org. Matter.*, 570–611.
- Cavan, E. L., Laurenceau-Cornec, E. C., Bressac, M., & Boyd, P. W. (2019). Exploring the ecology of the mesopelagic biological pump. *Progress in Oceanography*, 176, 102125. DOI: 10.1016/j.pocean.2019.102125
- Cawley, K. M., Butler, K. D., Aiken, G. R., Larsen, L. G., Huntington, T. G., & McKnight D. M. (2012). Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed. *Mar. Pollut. Bull.*, 64(8), 1678–1687. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.05.040
- Céa, B., Lefèvre, D., Chirurgien, L., Raimbault, P., Garcia, N., Charrière, B., ... & Van Wambeke, F. (2015). An annual survey of bacterial production, respiration and ectoenzyme activity in coastal NW Mediterranean waters: temperature and resource controls. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 13654-13668. DOI: 10.1007/s11356-014-3500-9
- Charlson, R. J., Lovelock, J. E., Andreae, M. O., & Warren, S. G. (1987). Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature*, 326(6114), 655-661. DOI: 10.1038/326655a0
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., & Booksh, K. (2003). Fluorescence excitation–emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental science & technology*, 37(24), 5701-5710. DOI: 10.1021/es034354c
- Chen, C. T. A., & Borges, A. V. (2009). Reconciling opposing views on carbon cycling in the coastal ocean: Continental shelves as sinks and near-shore ecosystems as sources of atmospheric CO₂. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(8-10), 578-590. DOI: 10.1016/j.dsr2.2009.01.001

- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., ... & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295-300. DOI : 10.1038/nature12354
- Chipman, L., Podgorski, D., Green, S., Kostka, J., Cooper, W., Huettel, M. (2010). Decomposition of plankton-derived dissolved organic matter in permeable coastal sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 55, 857-871. DOI: 10.4319/lo.2010.55.2.085
- Cho, B. C., & Azam, F. (1990). Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Marine Ecology Progress Series*, 63(1989), 253–259.
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., et al. (2013). IPCC-WG1AR5-Chapter6: Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (eds. Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., et al.). Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, USA, pp. 465–570.
- Claisse, D., Joanny, M., & Quintin, J. Y. (1992). Le réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). *Analisis*, 20(6).
- Cloern, J. E., Foster, S. Q., & Kleckner, A. E. (2014). Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. *Biogeosciences*, 11, 2477–2501. DOI: 10.5194/bg-11-2477-2014
- Coble, P.G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51(4), 325-346. DOI: 10.1016/0304-4203(95)00062-3
- Coble, P. G. (2007). Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. *Chemical reviews*, 107(2), 402-418.
- Coble, P. G., Lead, J., Baker, A., Reynolds, D. M., & Spencer, R. G. M. (2014). *Aquatic organic matter fluorescence*. Cambridge University Press, New York.
- Coclet, C., Garnier, C., Delpy, F., Jamet, D., Durrieu, G., & Le Poupon, C. (2018). Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton

- communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. *Prog. Oceanogr.*, 163, 196–213. DOI: 10.1016/j.pocean.2017.06.006
- Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., Omanovic, 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*. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00257
- Coclet, C., Garnier, C., Durrieu, G., D’Onofrio, S., Layglon, N., Briand, J. F., & Misson, B. (2020). Impacts of copper and lead exposure on prokaryotic communities from contaminated contrasted coastal seawaters: the influence of previous metal exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(6). DOI: 10.1093/femsec/fiaa048
- Collins, K. J., Le, P. J., & Williams, B. (1977). An automated photochemical method for the determination of dissolved organic carbon in sea and estuarine waters. *Marine chemistry*, 5(2), 123-141. DOI: 10.1016/0304-4203(77)90003-2
- Copin-Montégut, G., & Avril, B. (1993). Vertical distribution and temporal variation of dissolved organic carbon in the North-Western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 40(10), 1963-1972. DOI: 10.1016/0967-0637(93)90041-Z
- Cotner, J. B., Ammerman, J. W., Peele, E. R., & Bentzen, E. (1997). Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sargasso Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 13(2), 141-149. DOI: 10.3354/ame013141
- Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2000) Natural Assemblages of Marine Proteobacteria and Members of the Cytophaga-Flavobacter Cluster Consuming Low- and High-Molecular-Weight Dissolved Organic Matter. *ASM J.*, 66(4), 1692-1697. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1692-1697.2000
- Cram, J., Chow, CE., Sachdeva, R., Needham, D. M., Parada, A. E., Steele, J. A., & 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. DOI: 10.1038/ismej.2014.153

- Cram J. A., Parada A. E., & Fuhrman J. A. (2016) Dilution reveals how viral lysis and grazing shape microbial communities. *Limnology and Oceanography*, 61, 889-905. DOI: 10.1002/lno.10259
- Crump, B. C., Kling, G. W., Bahr, M., & Hobbie, J. E. (2003). Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2253-2268. DOI: 10.1128/AEM.69.4.2253-2268.2003
- Cullen, J. J. (1991). Hypotheses to explain high-nutrient conditions in the open sea. *Limnology and Oceanography*, 36(8), 1578-1599. DOI: 10.4319/lno.1991.36.8.1578
- Currie, D. J., & Jaap K. (1884). A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 29, 298-310. DOI: 10.4319/lno.1984.29.2.0298
- Cuss, C. W., Shi, Y. X., McConnell, S. M., & Guéguen, C. (2014). Changes in the fluorescence composition of multiple DOM sources over pH gradients assessed by combining parallel factor analysis and self-organizing maps. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 119(9), 1850-1860. DOI: 10.1002/2013JG002598
- Cuss, C. W., & Guéguen, C. (2015). Characterizing the labile fraction of dissolved organic matter in leaf leachates: methods, indicators, structure, and complexity. Labile organic matter—chemical compositions, function, and significance in soil and the environment, 62, 237-274. DOI: 10.2136/sssaspecpub62.2014.0043
- D'Andrilli, J., Foreman, C. M., Marshall, A. G., & McKnight, D. M. (2013). Characterization of IHSS Pony Lake fulvic acid dissolved organic matter by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. *Organic geochemistry*, 65, 19-28. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2013.09.013
- D'Andrilli, J., Cooper, W. T., Foreman, C. M., & Marshall, A. G. (2015). An ultrahigh-resolution mass spectrometry index to estimate natural organic matter lability. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 33(2), 193-202. DOI: 10.1002/rcm.8315

- Dadi, T., Wendt-Potthoff, K., & Koschorreck, M. (2017). Sediment resuspension effects on dissolved organic carbon fluxes and microbial metabolic potentials in reservoirs. *Aquatic Sciences*, 79, 749-764. DOI: 10.1007/s00027-017-0533-4
- Dang, D. H., Schäfer, J., Brach-Papa, C., Lenoble, V., Durrieu, G., Dutruch, L., ... & Garnier, C. (2015). Evidencing the impact of coastal contaminated sediments on mussels through Pb stable isotopes composition. *Environmental Science & Technology*, 49(19), 11438-11448. DOI: 10.1021/acs.est.5b01893
- Dang, D. H., Evans, R. D., Durrieu, G., El Houssainy, A., Mullot, J. U., Layglon, N., Lenoble, V., Mounier, S., & Garnier, C. (2018) Quantitative model of Carbon and Nitrogen isotope composition to highlight sources of nutrient discharge in coastal area (Toulon Bay, NW Mediterranean Sea). *Chemosphere*, Elsevier, 194, 543-552. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.109
- Dang, D. H., Layglon, N., Ferretto, N., Omanović, D., Mullot, J. U., Lenoble, V., Mounier, S., & Garnier, C. (2020) Kinetic processes of copper and lead remobilization during sediment resuspension of marine polluted sediments. *Science of The Total Environment*, 698, 134120. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134120.
- Davey, H. M., & Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews*, 60(4), 641-696. DOI: 10.1128/mr.60.4.641-696.1996
- De Madron, X. D., Denis, L., Diaz, F., Garcia, N., Guieu, C., Grenz, C., & Ridame, C. (2003). Nutrients and carbon budgets for the Gulf of Lion during the Moogli cruises. *Oceanologica Acta*, 26(4), 421-433. DOI: 10.1016/S0399-1784(03)00024-0
- Del Giorgio, P. A., & Cole, J. J. (1998). Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu. Rev. Ecol. System.*, 29, 503–541. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.503
- Del Giorgio, P., & Davies, J., (2003). Patterns of dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems. In: Findlay, S.E.G., Sinsabaugh, R.L. (Eds.), *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic*. DOI: 10.1016/B978-012256371-3/50018-4

- Delpy, F., Serranito, B., Jamet, J. L., Grégori, G., Le Poupon, C., & 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. DOI: 10.1007/s12237-018-0412-9
- Determann, S., Reuter, R., Wagner, P., & Willkomm, R. (1994). Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: method of measurement and near-surface distribution. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 41(4), 659-675. DOI: 10.1016/0967-0637(94)90048-5
- Determann, S., Lobbes, J. M., Reuter, R., & Rullkötter, J. (1998). Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Marine Chemistry*, 62(1-2), 137-156. DOI: 10.1016/S0304-4203(98)00026-7
- Dignan, C., Lenoble, V., Pringault, O., Misson, B. (submitted, a). An effect-based method to evaluate spatio-temporal variations of coastal marine DOM properties. *Journal of Marine Science and Engineering*.
- Dignan, C., Lenoble, V., Garcia, N., Oursel, B., Cindrić, A. M., Misson, B. (submitted, b). Hypervariable DOM properties in coastal NW Mediterranean Sea-Evidences of strong human influences and potential consequences for the heterotrophic base of planktonic food web. *Estuarine-Coastal and Shelf Science*.
- Dittmar, T., & Gerhard K. (2003). Recalcitrant dissolved organic matter in the ocean: major contribution of small amphiphilics. *Marine chemistry*, 82(1-2), 115-123. DOI: 10.1016/S0304-4203(03)00068-9
- Dittmar, T., & Koch, B. P. (2006). Thermogenic organic matter dissolved in the abyssal ocean. *Mar. Chem.*, 102, 208–217. DOI: 10.1016/j.marchem.2006.04.003
- Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn N., & Kattner, G. (2008). A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnol. Oceanogr. – Methods*, 6, 230. DOI: 10.4319/lom.2008.6.230
- Dittmar, T., & Paeng, J. (2009). A heat-induced molecular signature in marine dissolved organic matter. *Nat. Geosci.*, 2, 175–179. DOI:10.1038/ngeo440

- Dittmar, T., & Stubbins, A. (2014). 12.6-Dissolved organic matter in aquatic systems. *Treatise on geochemistry*, 2, 125-156.
- Dittmar, T. (2015). Chapter 7 - Reasons Behind the Long-Term Stability of Dissolved Organic Matter, Editor(s): Dennis A. Hansell, Craig A. Carlson, *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter (Second Edition)*, Academic Press, Pages 369-388, ISBN 9780124059405. DOI: 10.1016/B978-0-12-405940-5.00007-8.
- Dittmar, T., Lennartz, S. T., Buck-Wiese, H., Hansell, D. A., Santinelli, C., Vanni, C., Blasius, B., & Hehemann, J.-H. (2021). Enigmatic persistence of dissolved organic matter in the ocean. *Nat. Rev. Earth Environ.*, 2, 570–583. DOI: 10.1038/s43017-021-00183-7
- Dittmar, T., Lennartz, S.T., Buck-Wiese, H., Hansell, D. A., Santinelli, C., Vanni, C., Blasius, B., & Hehemann, J.-H. (2021). Enigmatic persistence of dissolved organic matter in the ocean. *Nat. Rev. Earth Environ.*, 2, 570–583. DOI: 10.1038/s43017-021-00183-7
- Ducklow H. W., & Carlson C. A. (1992). Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology*, 12, 113–81.
- Duclow, H. W., Kirchman, D. L., & Anderson, T. R. (2002). The magnitude of spring bacterial production in the North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 47, 1684–1693. DOI: 10.4319/lo.2002.47.6.1684
- Dufresne, C., Duffa, C., & Rey, V. (2014). Wind-forced circulation model and water exchanges through the channel in the Bay of Toulon. *Ocean Dynamics*, 64, 209-224. DOI: 10.1007/s10236-013-0676-3
- Durrieu, G., Layglon, N., D’Onofrio, S., Oursel, B., Omanović, D., Garnier, C., & Mounier, S. (2023). Extreme hydrological regimes of a small urban river: impact on trace element partitioning, enrichment and fluxes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(9), 1092. DOI: 10.1007/s10661-023-11622-x
- Dyhrman, S. T., Benitez-Nelson, C. R., Orchard, E. D., Haley, S. T., & Pellechia, P. J. (2009). A microbial source of phosphonates in oligotrophic marine systems. *Nature Geoscience*, 2(10), 696-699. DOI: 10.1038/ngeo639

- Egge, J. K. (1998). Are diatoms poor competitors at low phosphate concentrations?. *Journal of Marine Systems*, 16(3-4), 191-198. DOI: 10.1016/S0924-7963(97)00113-9
- Eiler, A., Langenheder, S., Bertilsson, S., & Tranvik, L. J. (2003). Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3701-3709. DOI : 10.1128/AEM.69.7.3701-3709.2003
- Elbaz-Poulichet, F., Dezileau, L., Freydier, R., Cossa, D., & Sabatier, P. (2011). A 3500-year record of Hg and Pb contamination in a Mediterranean sedimentary archive (The Pierre Blanche Lagoon, France). *Environmental science & technology*, 45(20), 8642-8647. DOI: 10.1021/es2004599
- Elifantz, H., Dittel, A. I., Cottrell, M. T., Kirchman, D. L. (2007). Dissolved organic matter assimilation by heterotrophic bacterial groups in the western Arctic Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.*, 50, 39-49. DOI:10.3354/ame01145
- Elovaara, S., Eronen-Rasimus, E., Asmala, E., Tamelander, T., & Kaartokallio, H. (2021). Contrasting patterns of carbon cycling and dissolved organic matter processing in two phytoplankton–bacteria communities. *Biogeosciences*, 18(24), 6589-6616. DOI: 10.5194/bg-18-6589-2021
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039. DOI: 10.1126/science.1153213
- Fanning, K. A., Carder, K. L., & Betzer, P. R. (1982). Sediment resuspension by coastal waters: a potential mechanism for nutrient re-cycling on the ocean's margins. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 29(8), 953-965. DOI: 10.1016/0198-0149(82)90020-6
- Farrington, J. (1992). Overview and key recommendations. Marine organic geochemistry workshop, January 1990. *Marine Chemistry*, 39, 5-9.
- Faure, D., & Joly, D. (2016). Insight on environmental genomics: the high-throughput sequencing revolution. Elsevier.

- Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J., & Millero, F. J. (2004). Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, 305(5682), 362-366. DOI: 10.1126/science.1097329
- Fellman, J. B., Hood, E., Edwards, R. T., & D'Amore, D. V. (2009a). Changes in the concentration, biodegradability, and fluorescent properties of dissolved organic matter during stormflows in coastal temperate watersheds. *J. Geophys. Res. Biogeosci.*, 114, G01021. DOI: 10.1029/2008JG000790
- Fellman, J. B., Hood, E., D'Amore, D. V., Edwards, R. T., & White, D. (2009b). Seasonal changes in the chemical quality and biodegradability of dissolved organic matter exported from soils to streams in coastal temperate watersheds. *Biogeochemistry*, 95, 277-293. DOI: 10.1007/s10533-009-9336-6
- Fellman, J. B., Hood, E., & Spencer, R. G. (2010). Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and oceanography*, 55(6), 2452-2462. DOI: 10.4319/lo.2010.55.6.2452
- Fenchel, T., & Blackburn, T. H. (1979). *Bacteria and mineral cycling*. New York: Academic.
- Ferenci, T. (2016). Trade-off mechanisms shaping the diversity of bacteria. *Trends in microbiology*, 24(3), 209-223. DOI: 10.1016/j.tim.2015.11.009
- Fernández-Gómez, B., Richter, M., Schüller, M. et al. (2013) Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME J.*, 7, 1026–1037. DOI: 10.1038/ismej.2012.169
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364. DOI: 10.1890/05-1839
- Fisher, S. G., & Likens, G. E. (1973). Energy flow in Bear Brook, New Hampshire: an integrative approach to stream ecosystem metabolism. *Ecological monographs*, 43(4), 421-439. DOI: 10.2307/1942301
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities.

- Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4630-4636. DOI: 10.1128/AEM.65.10.4630-4636.1999
- Foster, Z. S. L., Sharpton, T. J., & Grünwald, N. J. (2017). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Comput. Biol.*, 13(2): e1005404. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005404
- Frankignoulle, M., Abril, G., Borges, A., Bourge, I., Canon, C., Delille, B., ... & Théate, J. M. (1998). Carbon dioxide emission from European estuaries. *Science*, 282(5388), 434-436. DOI: 10.1126/science.282.5388.434
- Fuhrman, J. A., Comeau, D. E., Hagström, Å., & Chan, A. M. (1988). Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1426-1429. DOI: 10.1128/aem.54.6.1426-1429.1988
- Fuhrman, J. A., & Noble, R. T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and oceanography*, 40(7), 1236-1242. DOI: 10.4319/lo.1995.40.7.1236
- Fuhrman J. A., & Hagström A. F. K. (2008) Bacterial and Archaeal community structure and its patterns. *Microbial Ecology of the Oceans*, Second Edition.
- Fuhrman, J. A., & Steele, J. A. (2008). Community structure of marine bacterioplankton: patterns, networks, and relationships to function. *Aquatic Microbial Ecology*, 53(1), 69-81. DOI: 10.3354/ame01222
- Gabor, R. S., Baker, A., McKnight, D. M., & Miller, M. P. (2014). Fluorescence indices and their interpretation. *Aquatic organic matter fluorescence*, 303.
- Gaillard, C., Weber, M., Strauss, F., Varshavsky, A. (1990). Ethanol precipitation of dna with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.*, 18, 378–378. DOI: 10.1093/NAR/18.2.378
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., ... & Vöösmary, C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70, 153-226. DOI: 10.1007/s10533-004-0370-0

- Garcia-Solsona, E., García-Orellana, J., Masqué, P., Garcés, E., Radakovitch, O., Mayer, A., & Basterretxea, G. (2010). An assessment of karstic submarine groundwater and associated nutrient discharge to a Mediterranean coastal area (Balearic Islands, Spain) using radium isotopes. *Biogeochemistry*, 97, 211-229. DOI: 10.1007/s10533-009-9368-y
- Gasol, J. M., & Del Giorgio, P. A. (2000). Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 64(2), 197-224. DOI: 10.3989/scimar.2000.64n2197
- Gattuso, J. P., Frankignoulle, M., & Wollast, R. (1998). Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 405-434. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.405
- Gilbert, J. A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., ... & Joint, I. (2009). The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel. *Environmental microbiology*, 11(12), 3132-3139. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02017.x
- Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., ... & Field, D. (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *The ISME journal*, 6(2), 298-308. DOI: 10.1038/ismej.2011.107
- Goldman, J. C., Caron, D. A., & Dennett, M. R. (1987). Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C: N ratio. *Limnology and Oceanography*, 32(6), 1239-1252. DOI: 10.4319/lo.1987.32.6.1239
- Goldman, J. H., Rounds, S. A., & Needoba, J. A. (2012). Applications of fluorescence spectroscopy for predicting percent wastewater in an urban stream. *Environmental science & technology*, 46(8), 4374-4381. DOI: 10.1021/es2041114
- Gonsior, M., et al. (2011). Molecular characterization of effluent organic matter identified by ultrahigh resolution mass spectrometry. *Water research*, 45(9), 2943-2953. DOI: 10.1016/j.watres.2011.03.016

- Gonsior, M., Powers, L., Lahm, M., & McCallister, S. L. (2022) New perspectives on the marine carbon cycle – The marine dissolved organic matter reactivity continuum. *Environ. Sci. Technol.*, 56, 9, 5371-5380. DOI: 10.1021/acs.est.1c08871
- Graf, G., & Rosenberg, R. (1997). Bioresuspension and biodeposition: a review. *Journal of Marine Systems*, 11(3-4), 269-278. DOI: 10.1016/S0924-7963(96)00126-1
- Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., Denis, M. (2001). Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4662–70. DOI: 10.1128/aem.67.10.4662-4670.2001
- Guigue, C., Tedetti, M., Dang, D. H., Mullot, J. U., Garnier, C., 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). *Environmental Pollution*, 229, 627-638. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.090
- Guillaud, J. F., & Romaña, L. A. (1991). La Mer et les rejets urbains: Bendor, 13-15 juin 1990 (Vol. 11). Editions Quae
- Guo, L., & Santschi, P. H. (2000). Sedimentary sources of old high molecular weight dissolved organic carbon from the ocean margin benthic nepheloid layer. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(4), 651-660. DOI: 10.1016/S0016-7037(99)00335-X
- Gustavson, K., Petersen, S., Pedersen, B., Stuer-Lauridsen, F., Pedersen, S., & Wängberg, S. Å. (1999). Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in coastal phytoplankton communities exposure to copper. *Hydrobiologia*, 416, 125-138. DOI: 10.1023/A:1003811419842
- Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C. V., Micheli, F., & D'agrosa, C. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319, 948–952. DOI: 10.1126/science.1149345
- Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (1998). Deep-ocean gradients in the concentration of dissolved organic carbon. *Nature*, 395(6699), 263-266. DOI: 10.1038/26200

- Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (2001). Marine dissolved organic matter and the carbon cycle. *Oceanography*, 14 (4), 41-49. DOI: 10.5670/oceanog.2001.05
- Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (2002). Biogeochemistry of marine dissolved organic matter. Academic Press, San Diego (USA), 774 pp.
- Hansell, D. A., Carlson, C. A., & Suzuki, Y. (2002). Dissolved organic carbon export with North Pacific Intermediate Water formation. *Global Biogeochem. Cycles*, 16, 7-1-7-8. DOI: 10.1029/2000GB001361
- Hansell, D. A. (2005). Dissolved Organic Carbon Reference Material Program. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 86, 318. DOI: 10.1029/2005EO350003
- Hansell, D. A., Carlson, C. A., Repeta, D. J., & Schlitzer, R. (2009). Dissolved organic matter in the ocean. A controversy stimulates new insights. *Oceanography*, 22, 202–211. DOI: 10.5670/oceanog.2009.109
- Hansell, D. A., Carlson, C. A., & Schlitzer, R. (2012). Net removal of major marine dissolved organic carbon fractions in the subsurface ocean. *Global Biogeochem. Cycles*, 26, 0886–6236. DOI: 10.1029/2011GB004069
- Hansell, D.A. (2013). Recalcitrant dissolved organic carbon fractions. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 5, 421-445. DOI: 10.1146/annurev-marine-120710-100757.
- Hansell, D. A., & Orellana, M. V. (2021). Dissolved Organic Matter in the Global Ocean: A Primer. *Gels*, 7, 128. DOI: 10.3390/gels7030128
- Harfmann, J. L., Avery Jr, G. B., Rainey, H. D., Mead, R. N., Skrabal, S. A., Kieber, R. J., ... & Podgorski, D. C. (2021). Composition and lability of photochemically released dissolved organic matter from resuspended estuarine sediments. *Organic Geochemistry*, 151, 104164. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2020.104164
- Hatcher, P. G., & Spiker, E. C. (1988). Selective degradation of plant biomolecule. p. 59-74. *In* F. H. Frimmel and R. F. Christman (ed.) *Humic substances and their role in the environment*. John Wiley & Sons, Chichester.

- Hecky, R. E., & Kilham, P. (1988). Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment 1. *Limnology and oceanography*, 33(4part2), 796-822. DOI: 10.4319/lo.1988.33.4part2.0796
- Hedges, J. I., Clark, W. A., & Come, G. L. (1988). Fluxes and reactivities of organic matter in a coastal marine bay. *Limnology and Oceanography*, 33(5), 1137-1152. DOI: 10.4319/lo.1988.33.5.1137
- Hedges, J. I., Hatcher, P. G., Ertel, J. R., & Meyers-Schulte, K. J. (1992). A comparison of dissolved humic substances from seawater with Amazon River counterparts by ¹³C-NMR spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56 (4), 1753–1757. DOI: 10.1016/0016-7037(92)90241-A
- Hein, M., & Riemann, B. (1995). Nutrient limitation of phytoplankton biomass or growth rate: an experimental approach using marine enclosures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 188(2), 167-180. DOI: 10.1016/0022-0981(95)00002-9
- Henderson, R. K., Baker, A., Murphy, K. R., Hambly, A., Stuetz, R. M., & Khan, S. J. (2009). Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: a review. *Water research*, 43(4), 863-881. DOI: 10.1016/j.watres.2008.11.027
- Hernandez-Magana, A. E., Liu, Y., Debeljak, P., Crispi, O., Marie, B., Koedooder, C., & Obernosterer, I. (2021). Prokaryotic diversity and activity in contrasting productivity regimes in late summer in the Kerguelen region (Southern Ocean). *Journal of Marine Systems*, 221. DOI: 10.1016/j.jmarsys.2021.103561.
- Hertkorn, N., Frommberger, M., Witt, M., Koch, B. P., Schmitt-Kopplin, P., & Perdue, E. M. (2008). Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(23), 8908-8919. DOI: 10.1021/ac800464g
- Hertkorn, N., et al. (2013). High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter. *Biogeosciences*, 10(3), 1583-1624. DOI: 10.5194/bg-10-1583-2013

- Honjo, S., Eglinton, T. I., Taylor, C. D., Ulmer, K. M., Sievert, S. M., Bracher, A., ... & Repeta, D. J. (2014). Understanding the role of the biological pump in the global carbon cycle: an imperative for ocean science. *Oceanography*, 27(3), 10-16. <https://www.jstor.org/stable/24862184>
- Hood, E., Fellman, J. B., Spencer, R. G. M., Hernes, P. J., Edward, R., David D'Amore, D., & Scott, D. (2009). Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine environment. *Nature*, 462, 1044-1048. DOI: 10.1038/nature08580
- Hopkinson, C. S., Buffam, I., Hobbie, J., Vallino, J., Perdue, M., Eversmeyer, B., ... & Foreman, K. (1998). Terrestrial inputs of organic matter to coastal ecosystems: An intercomparison of chemical characteristics and bioavailability. *Biogeochemistry*, 43, 211-234. DOI: 10.1023/A:1006016030299
- Hudson, N., Baker, A., & Reynolds, D. (2007). Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - a review. *River Research and Applications*, 23(6), 631-649. DOI: 10.1002/rra.1005
- Hudson, N., Baker, A., Ward, D., Reynolds, D. M., Brunson, C., Carliell-Marquet, C., & Browning, S. (2008). Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment: An example from South West England. *Sci. Tot. Environ.*, 391(1), 149-158. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.10.054
- Huguet, A., Vacher, L., Saubusse, S., Etcheber, H., Abril, G., Relexans, S., ... & Parlanti, E. (2010). New insights into the size distribution of fluorescent dissolved organic matter in estuarine waters. *Organic Geochemistry*, 41(6), 595-610. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2010.02.006
- Hwang, D. W., Kim, G., Lee, Y. W., & Yang, H. S. (2005). Estimating submarine inputs of groundwater and nutrients to a coastal bay using radium isotopes. *Marine Chemistry*, 96(1-2), 61-71. DOI: 10.1016/j.marchem.2004.11.002
- IPCC. (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writ. Team, R.K. Pachauri L.A. Meyer. Geneva, Switzerland.

- Ishii, S. K., & Boyer, T. H. (2012). Behavior of reoccurring PARAFAC components in fluorescent dissolved organic matter in natural and engineered systems: a critical review. *Environmental science & technology*, 46(4), 2006-2017. DOI: 10.1021/es2043504
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., et al. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 593–99. DOI: 10.1038/nrmicro2386
- Jiao, N., & Zheng, Q. (2011). The Microbial Carbon Pump: from Genes to Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 7439–7444. DOI: 10.1128/AEM.05640-11
- Jonsson, S., Andersson, A., Nilson, M. B., Skyllberg, U., Lundberg, E., Schaefer, J. K., Akerblom, S., & Björn, E. (2017). Terrestrial discharges mediate trophic shifts and enhance methylmercury accumulation in estuarine biota. *Science Advances*, 3(1), e1601239. DOI: 10.1126/sciadv.1601239
- Karl, D. M. (2002). Nutrient dynamics in the deep blue sea. *TRENDS in Microbiology*, 10(9), 410-418. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)02430-7
- Karl, D. M., & Björkman, K. M. (2015). Dynamics of dissolved organic phosphorus. In *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter* (pp. 233-334). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-405940-5.00005-4
- Kieber, R. J., Zhou, X., & Mopper, K. (1990). Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: Fate of riverine carbon in the sea. *Limnology and Oceanography*, 35(7), 1503-1515. DOI: 10.4319/lo.1990.35.7.1503
- Keil, R. G., & Kirchman, D. L. (1994). Abiotic transformation of labile protein to refractory protein in sea water. *Marine Chemistry*, 45(3), 187-196. DOI: 10.1016/0304-4203(94)90002-7
- Kellerman, A. M., Dittmar, T., Kothawala, D. N., & Tranvik, L. J. (2014). Chemodiversity of dissolved organic matter in lakes driven by climate and hydrology. *Nature communications*, 5(1), 3804. DOI: 10.1038/ncomms4804

- Kim, S., Kramer, R. W., & Hatcher, P. G. (2003) Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram. *Anal. Chem.*, 75, 5336. DOI: 10.1021/ac034415p
- Kirchman, D. L. (1994). The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology*, 28, 255-271. DOI: 10.1007/BF00166816
- Kirchman, D. L. (2000). Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. *Microbial ecology of the oceans*.
- Kirchman, D. L. (2002). The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(2), 91–100. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x
- Kirchman, D. L. (2004). A primer on dissolved organic material and heterotrophic prokaryotes in the oceans. *In The ocean carbon cycle and climate*, 31-63. Springer Netherlands.
- Kirchman, D. L. (2008). New light on an important microbe in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8487-8488. DOI: 10.1073/pnas.0804196105
- Kirchman, D. L. (2012). Degradation of organic material. *Processes in microbial ecology*. Oxford University Press Inc., New York, NY, 79-98.
- Kirchman, D. L. (2012). Marine archaea take a short cut in the nitrogen cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), 17732-17733. DOI: 10.1073/pnas.1215654109
- Kirchman, D. L. (2016). Growth rates of microbes in the oceans. *Annual review of marine science*, 8, 285-309. DOI: 10.1146/annurev-marine-122414-033938
- Klappenbach J.A., Dunbar J.M., & Schmidt T.M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *American Society for Microbiology*, 66(4) 1328-1333. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000
- Koch A.L. (2001). Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays*, 23, 657-661. DOI: 10.1002/bies.1091

- Koch, B. P., Witt, M., Engbrodt, R., Dittmar, T., & Kattner, G. (2005). Molecular formulae of marine and terrigenous dissolved organic matter detected by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(13), 3299-3308. DOI: 10.1016/j.gca.2005.02.027
- Koch, B. P., & Dittmar, T. (2006). From mass to structure: An aromaticity index for high-resolution mass data of natural organic matter. *Rapid communications in mass spectrometry*, 20(5), 926-932. DOI: 10.1002/rcm.2386
- Koelmans, A. A., & Prevo, L. (2003). Production of dissolved organic carbon in aquatic sediment suspensions. *Water research*, 37(9), 2217-2222. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00581-X
- Komada, T., & Reimers, C. E. (2001). Resuspension-induced partitioning of organic carbon between solid and solution phases from a river–ocean transition. *Marine Chemistry*, 76(3), 155-174. DOI: 10.1016/S0304-4203(01)00055-X
- Komada, T., Schofield, O. M., & Reimers, C. E. (2002). Fluorescence characteristics of organic matter released from coastal sediments during resuspension. *Marine Chemistry*, 79(2), 81-97. DOI: 10.1016/S0304-4203(02)00056-7
- Konstantinidis K.T., & Tiedje J.M. (2003) Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *PNAS*, 101(9) 3160-3165. DOI: 10.1073/pnas.030865310
- Korlević, M., Zucko, J., Dragić, M. N., Blažina, M., Pustijanac, E., Zeljko, T. V., Gacesa, R., Baranasic, D., Starcevic, A., Diminic, J., Long, P. F., Cullum, J., Hranueli, D., & Orlić, S. (2015). Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(3), 189-197. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.03.001
- Korshin, G. V., Li, C. W., & Benjamin, M. M. (1997). Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Research*, 31(7), 1787-1795. DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00006-7

- Koschinsky, A., Gaye-Haake, B., Arndt, C., Maue, G., Spitzzy, A., Winkler, A., & Halbach, P. (2001). Experiments on the influence of sediment disturbances on the biogeochemistry of the deep-sea environment. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48(17-18), 3629-3651. DOI: 10.1016/S0967-0645(01)00060-1
- Kothawala, D. N., Stedmon, C. A., Müller, R. A., Weyhenmeyer, G. A., Köhler, S. J., & Tranvik, L. J. (2014). Controls of dissolved organic matter quality: Evidence from a large-scale boreal lake survey. *Global change biology*, 20(4), 1101-1114. DOI: 10.1111/gcb.12488
- Kovárová-Kovar, K., & Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 646-666. DOI: 10.1128/mubr.62.3.646-666.1998
- Kowalczyk, P., Tilstone, G. H., Zablocka, M., Röttgers, R., Thomas, R. (2013). Composition of dissolved organic matter along an Atlantic Meridional Transect from fluorescence spectroscopy and Parallel Factor Analysis. *Marine Chemistry*, 157, 170-184. DOI: 10.1016/j.marchem.2013.10.004
- Kress, N., & Herut, B. (2001). Spatial and seasonal evolution of dissolved oxygen and nutrients in the Southern Levantine Basin (Eastern Mediterranean Sea): chemical characterization of the water masses and inferences on the N: P ratios. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 48(11), 2347-2372. DOI: 10.1016/S0967-0637(01)00022-X
- Kritzberg, E. S., Arrieta, J. M., & Duarte, C. M. (2010). Temperature and phosphorus regulating carbon flux through bacteria in a coastal marine system. *Aquatic Microbial Ecology*, 58(2), 141-151. DOI: 10.3354/ame01368
- Kroer, N. (1993). Bacterial growth efficiency on natural dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 38(6), 1282-1290. DOI: 10.4319/lo.1993.38.6.1282
- Krom, M. D., Kress, N., Brenner, S., & Gordon, L. I. (1991). Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 36(3), 424-432. DOI: 10.4319/lo.1991.36.3.0424

- Kujawinski, E. B., Freitas, M. A., Zang, X., Hatcher, P. G., Green-Church, K. B., & Jones, R. B. (2002). The application of electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter. *Organic geochemistry*, 33(3), 171-180. DOI: 10.1016/S0146-6380(01)00149-8
- Kujawinski, E. B., & Behn, M. D. (2006). Automated analysis of electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra of natural organic matter. *Analytical chemistry*, 78(13), 4363-4373. DOI: 10.1021/ac0600306
- Kunenkov, E. V., Kononikhin, A. S., Perminova, I. V., Hertkorn, N., Gaspar, A., Schmitt-Kopplin, P., ... & Nikolaev, E. N. (2009). Total mass difference statistics algorithm: a new approach to identification of high-mass building blocks in electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry data of natural organic matter. *Analytical chemistry*, 81(24), 10106-10115. DOI: 10.1021/ac901476u
- Labry, C., Delmas, D., & Herbland, A. (2005). Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activities in relation to phosphate and DOP availability within the Gironde plume waters (Bay of Biscay). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318(2), 213-225. DOI: 10.1016/j.jembe.2004.12.017
- Lagerström, M., Ytreberg, E., Wiklund, A. K. E., & Granhag, L. (2020). Antifouling paints leach copper in excess – study of metal release rates and efficacy along a salinity gradient. *Water research*, 186, 116383. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116383
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Boston, MA: springer US.
- Lambert T., Bouillon S., Darchambeau F., Morana C., Roland F.A.E., Descy J-P., & Borges A.V. (2017) Effects of human land use on the terrestrial and aquatic sources of fluvial organic matter in a temperate river basin (The Meuse River, Belgium). *Biogeochemistry*, 136. DOI:10.1007/s10533-017-0387-9
- Landry, M. R., & Hassett, R. P. L. (1982). Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Marine biology*, 67, 283-288. DOI: 10.1007/BF00397668
- Langdon, C. (1993). The significance of respiration in production measurements based on oxygen. In *ICES Mar. Sci. Symp* (Vol. 197, pp. 69-78).

- Laubier, L. (2005). Mediterranean Sea and humans: Improving a conflictual partnership. *The Mediterranean Sea*, 3-27. DOI: 10.1007/b107142
- Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S., ... & Cavicchioli, R. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15527-15533. DOI: 10.1073/pnas.0903507106
- Layglon, N., Misson, B., Durieu, G., Coclet, C., d'Onofrio, S., Dang, D. H., ... & Garnier, C. (2020). Long-term monitoring emphasizes impacts of the dredging on dissolved Cu and Pb contamination along with ultraplankton distribution and structure in Toulon Bay (NW Mediterranean Sea, France). *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111196. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111196
- Layglon, N., Lenoble, V., Longo, L., D'Onofrio, S., Mounier, S., Mullot, J. U., ... & Misson, B. (2022). Cd transfers during marine sediment resuspension over short and long-term period: Associated risk for coastal water quality. *Marine Pollution Bulletin*, 180, 113771. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.113771
- Lawaetz, A. J., & Stedmon, C. A. (2009). Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water. *Applied spectroscopy*, 63(8), 936-940. DOI: 10.1366/000370209788964548
- Le Quéré, C., Raupach, M. R., Canadell, J. G., Marland, G., Bopp, L., Ciais, P., ... & Woodward, F. I. (2009). Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature geoscience*, 2(12), 831-836. DOI: 10.1038/ngeo689
- Le Quéré, C., Moriarty, R., Andrew, R. M., Canadell, J. G., Sitch, S., Korsbakken, J. I., ... & Zeng, N. (2015). Global Carbon Budget 2015, *Earth Syst. Sci. Data*, 7, 349–396. DOI:10.5194/essd-7-349-2015
- Lee, C., Schwab, D. J., & Hawley, N. (2005). Sensitivity analysis of sediment resuspension parameters in coastal area of southern Lake Michigan. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 110(C3). DOI: doi.org/10.1029/2004JC002326

- Lee, M. H., Lee, S. Y., Yoo, H. Y., Shin, K. H., & Hur, J. (2020). Comparing optical versus chromatographic descriptors of dissolved organic matter (DOM) for tracking the non-point sources in rural watersheds. *Ecological Indicators*, 117, 106682. DOI: 10.1016/j.ecolind.2020.106682
- Leefmann, T., Frickenhaus, S., & Koch, B.P (2019). UltraMassExplorer - a browser-based application for the evaluation of high-resolution mass spectrometric data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 33, 193–202. DOI: 10.1002/rcm.8315
- Leenheer, J. A., & Croué, J. P. (2003). Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental science & technology*, 37(1), 18A-26A.
- Lennartz, S. T., & Dittmar, T. (2022). Controls on turnover of marine dissolved organic matter—testing the null hypothesis of purely concentration-driven uptake: Comment on Shen and Benner, “Molecular properties are a primary control on the microbial utilization of dissolved organic matter in the ocean”. *Limnol. Oceanogr.*, 67, 673-679. DOI: 10.1002/lno.12028
- Li, C., Hu, H. W., Chen, Q. L., Yan, Z. Z., Nguyen, B. A. T., Chen, D., & He, J. Z. (2021). Niche specialization of comammox Nitrospira clade A in terrestrial ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108231. DOI: 10.1016/j.soilbio.2021.108231
- Liu, L., Yang, J., Lv, H., & Yu, Z. (2014). Synchronous dynamics and correlations between bacteria and phytoplankton in a subtropical drinking water reservoir. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 126-138. DOI: 10.1111/1574-6941.12378
- Logue J.B., Stedmon C.A., Kellerman A.M., Nielsen N.J., Andersson A.F., Laudon H., Lindström E.S., & Kritzberg E.S. (2016). Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter. *ISME J.*, 10, 533–545. DOI: 10.1038/ismej.2015.131
- Lomas, M. W., Burke, A. L., Lomas, D. A., Bell, D. W., Shen, C., Dyhrman, S. T., & Ammerman, J. W. (2010). Sargasso Sea phosphorus biogeochemistry: an important role for dissolved organic phosphorus (DOP). *Biogeosciences*, 7(2), 695-710. DOI: 10.5194/bg-7-695-2010

- Lønborg, C., Davidson, K., Álvarez-Salgado, X. A., & Miller, A. E. (2009). Bioavailability and bacterial degradation rates of dissolved organic matter in a temperate coastal area during an annual cycle. *Marine Chemistry*, 113(3-4), 219-226. DOI: 10.1016/j.marchem.2009.02.003
- Lønborg, C., Alvarez-Salgado, X. A., Davidson, K., Martinez-Garcia, S., & Teira, E. (2010). Assessing the microbial bioavailability and degradation rate constants of dissolved organic matter by fluorescence spectroscopy in the coastal upwelling system of the Ría de Vigo. *Marine Chemistry*, 119(1-4), 121-129. DOI: 10.1016/j.marchem.2010.02.001
- Lønborg, C., & Álvarez-Salgado, X. A. (2012). Recycling versus export of bioavailable dissolved organic matter in the coastal ocean and efficiency of the continental shelf pump. *Global biogeochemical cycles*, 26(3). DOI: 10.1029/2012GB004353
- Lønborg, C., & Álvarez-Salgado, X. A. (2014). Tracing dissolved organic matter cycling in the eastern boundary of the temperate North Atlantic using absorption and fluorescence spectroscopy. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 85, 35-46. DOI: 10.1016/j.dsr.2013.11.002
- Lønborg, C., Álvarez-Salgado, X. A., Duggan, S., & Carreira, C. (2018). Organic matter bioavailability in tropical coastal waters: the Great Barrier Reef. *Limnol. Oceanogr.*, 63, 1015–1035. DOI: 10.1002/lno.10717
- Louis, Y., Garnier, C., Lenoble, V., Mounier, S., Cukrov, N., Omanović, D., & Pižeta, I. (2009). Kinetic and equilibrium studies of copper-dissolved organic matter complexation in water column of the stratified Krka River estuary (Croatia). *Marine Chemistry*, 114(3-4), 110-119. DOI: 10.1016/j.marchem.2009.04.006
- Lucea, A., Duarte, C. M., Agusti, S., & Sondergaard, M. (2003). Nutrient (N, P and Si) and carbon partitioning in the stratified NW Mediterranean. *J. Sea Res.*, 49, 157–170. DOI: 10.1016/S1385-1101(03)00005-4
- Maat, D. S., Visser, R. J., & Brussaard, C. P. (2019a). Virus removal by glacier-derived suspended fine sediment in the Arctic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 521, 151227. DOI: 10.1016/j.jembe.2019.151227

- Maat, D. S., Prins, M. A., & Brussaard, C. P. (2019b). Sediments from arctic tide-water glaciers remove coastal marine viruses and delay host infection. *Viruses*, 11(2), 123. DOI: 10.3390/v11020123
- MacArthur R. H., & Wilson E. O. (1967). The theory of island biogeography. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., & Horning, S. (2006a). Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17, 977-982. DOI: 10.1016/j.jasms.2006.03.006
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., & Horning, S. (2006b). Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical chemistry*, 78(7), 2113-2120. DOI: 10.1021/ac0518811
- Marshall, A. G., & Hendrickson, C. L. (2008). High-resolution mass spectrometers. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1, 579-599. DOI: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112945
- Martínez, M. F., Arelovich, H. M., & Wehrhahne, L. N. (2010). Grain yield, nutrient content and lipid profile of oat genotypes grown in a semiarid environment. *Field crops research*, 116(1-2), 92-100. DOI: 10.1016/j.fcr.2009.11.018
- Martinot, P. L., Guigue, C., Chifflet, S., Cuny, P., Barani, A., Didry, M., ... & Tedetti, M. (2023). Assessing the bioavailability of black carbon-derived dissolved organic matter for marine heterotrophic prokaryotes. *Science of The Total Environment*, 165802. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165802
- Marty, J. C., & Chiavérini, J. (2002). Seasonal and interannual variations in phytoplankton production at DYFAMED time-series station, northwestern Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(11), 2017-2030. DOI: 10.1016/S0967-0645(02)00025-5
- Mayer, L. M. (1994). Relationships between mineral surfaces and organic carbon concentrations in soils and sediments. *Chemical Geology*, 114(3-4), 347-363. DOI: 10.1016/0009-2541(94)90063-9

- Mazoyer, C., Vanneste, H., Dufresne, C., Ourmieres, Y., Magaldi, M. G., & Molcard, A. (2020). Impact of wind-driven circulation on contaminant dispersion in a semi-enclosed bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106529. DOI: 10.1016/j.ecss.2019.106529
- McCarren, J., Becker, J. W., Repeta, D. J., Shi, Y., Young, C. R., Malmstrom, R. R., ... & DeLong, E. F. (2010). Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16420-16427. DOI: 10.1073/pnas.1010732107
- McKnight, D. M., & Aiken, G. R. (1998). Sources and age of aquatic humus, in *Aquatic Humic Substances*, 1re éd., edited by D. Hessen and L. Tranvik, 9-39, Springer, Berlin.
- McKnight, D. M., Boyer, E. W., Westerhoff, P. K., Doran, P. T., Kulbe, T., & Andersen, D. T. (2001). Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography*, 46(1), 38-48. DOI: 10.4319/lo.2001.46.1.0038
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013) phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4): e61217. DOI: 10.1371/journal.pone.0061217
- Mehrshad, M., Rodriguez-Valera, F., Amoozegar, M. A., López-García, P., & Ghai, R. (2018). The enigmatic SAR202 cluster up close: shedding light on a globally distributed dark ocean lineage involved in sulfur cycling. *The ISME journal*, 12(3), 655-668. DOI: 10.1038/s41396-017-0009-5
- Meng, F., Huang, G., Yang, X., Li, Z., Li, J., Cao, J., ... & Sun, L. (2013). Identifying the sources and fate of anthropogenically impacted dissolved organic matter (DOM) in urbanized rivers. *Water research*, 47(14), 5027-5039. DOI: 10.1016/j.watres.2013.05.043
- Mentges, A., C. Feenders, C. Deutsch, B. Blasius, & Dittmar, T. (2019). Long-term stability of marine dissolved organic carbon emerges from a neutral network of compounds and microbes. *Sci. Rep.*, 9, 17780. DOI:10.1038/s41598-019-54290-z

- Mentges, A., C. Deutsch, C. Feenders, S. T. Lennartz, B. Blasius, & Dittmar, T. (2020). Microbial Physiology Governs the Oceanic Distribution of Dissolved Organic Carbon in a Scenario of Equal Degradability. *Front. Mar. Sci.*, 7, 2296– 7745. DOI: 10.3389/fmars.2020.549784
- Merchant, S. S., & Helmann, J. D. (2012). Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Advances in microbial physiology*, 60, 91-210. DOI: 10.1016/B978-0-12-398264-3.00002-4
- Meyers, P. A., & Lallier-Vergès, E. (1999). Lacustrine sedimentary organic matter records of Late Quaternary paleoclimates. *Journal of Paleolimnology*, 21, 345-372. DOI: 10.1023/A:1008073732192
- Migon, C., Sandroni, V., & Béthoux, J. P. (2001). Atmospheric input of anthropogenic phosphorus to the northwest Mediterranean under oligotrophic conditions. *Marine Environmental Research*, 52(5), 413-426. DOI: 10.1016/S0141-1136(01)00095-2
- Miki, T., & Yamamura, N. (2005). Theoretical model of interactions between particle-associated and free-living bacteria to predict functional composition and succession in bacterial communities. *Aquatic microbial ecology*, 39(1), 35-46. DOI: 10.3354/ame039035
- Miller, W. L., & Zepp, R. G. (1995). Photochemical production of dissolved inorganic carbon from terrestrial organic matter: Significance to the oceanic organic carbon cycle. *Geophysical Research Letters*, 22(4), 417-420. DOI: 10.1029/94GL03344
- Minor, E. C., Swenson, M. M., Mattson, B. M., & Oyler, A. R. (2014). Structural characterization of dissolved organic matter: A review of current techniques for isolation and analysis. *Environ. Sci. Processes Impacts*, 16, 2064. DOI: 10.1039/C4EM00062E
- Misson, B., Garnier, C., Lauga, B., Dang, D. H., Ghiglione, J. F., Mullet, J. U., ... & Pringault, O. (2016). Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. *Science of the Total Environment*, 556, 319-329. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.038

- Mobed, J. J., Hemmingsen, S. L., Autry, J. L., & McGown, L. B. (1996). Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental science & technology*, 30(10), 3061-3065. DOI: 10.1021/es9601321
- Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., & Herndl, G. J. (1999). Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3518-3525. DOI: 10.1128/AEM.65.8.3518-3525.1999
- Moore, W. S., & Reid, D. F. (1973). Extraction of radium from natural waters using manganese-impregnated acrylic fibers. *J. Geophys. Res.* 78, 8880-8886. DOI: 10.1029/JC078i036p08880
- Moore, W. S. (2000). Ages of continental shelf waters determined from ²²³Ra and ²²⁴Ra. *J. Geophys. Res.*, 105, 22117. DOI: 10.1029/1999JC000289
- Moore, W. S., Blanton, J. O., & Joye, S. B. (2006). Estimates of flushing times, submarine groundwater discharge, and nutrient fluxes to Okatee Estuary, South Carolina. *J. Geophys. Res. Oceans.*, 111, C09006. DOI: 10.1029/2005JC003041
- Moore, W. S. (2008). Fifteen years experience in measuring ²²⁴Ra and ²²³Ra by delayed-coincidence counting. *Marine Chemistry*, 109(3-4), 188-197. DOI: 10.1016/j.marchem.2007.06.015
- Moore, W. S. (2010). The effect of submarine groundwater discharge on the ocean. *Annual review of marine science*, 2, 59-88. DOI: 10.1146/annurev-marine-120308-081019
- Mopper, K., Zhou, X., Kieber, R. J., Kieber, D. J., Sikorski, R. J., & Jones, R. D. (1991). Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. *Nature*, 353(6339), 60-62. DOI: 10.1038/353060a0
- Mopper, K., & Kieber, D. J. (2002). Photochemistry and the cycling of carbon, sulfur, nitrogen and phosphorus. p. 455-489. In D. Hansell and C. Carlson (ed.) *Biogeochemistry of marine organic matter*. Academic Press.

- Mopper, K., Stubbins, A., Ritchie, J. D., Bialk, H. M., & Hatcher, P. G. (2007). Advanced instrumental approaches for characterization of marine dissolved organic matter: extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Reviews*, 107(2), 419-442. DOI: 10.1021/cr050359b
- Moran, M. A., & Zepp, R. G. (1997). Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnology and oceanography*, 42(6), 1307-1316.
- Moran, M. A., Kujawinski, E. B., Stubbins, A., Fatland, R., Aluwihare, L. I., Buchan, A., ... & Waldbauer, J. R. (2016). Deciphering ocean carbon in a changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3143-3151. DOI: 10.1073/pnas.1514645113
- Mostofa, K. M. G. (2009). Dissolved organic matter in the aquatic environments. *Natural organic matter and its significance in the environment*, 3-66. DOI: 10.4319/lo.1997.42.6.1307
- Mostofa, K. M., Wu, F., Liu, C. Q., Fang, W. L., Yuan, J., Ying, W. L., ... & Yi, M. (2010). Characterization of Nanming River (southwestern China) sewerage-impacted pollution using an excitation-emission matrix and PARAFAC. *Limnology*, 11, 217-231. DOI: 10.1007/s10201-009-0306-4
- Mostofa, K. M., Liu, C. Q., Mottaleb, M. A., Wan, G., Ogawa, H., Vione, D., ... & Wu, F. (2013). Dissolved organic matter in natural waters. *Photobiogeochemistry of organic matter: principles and practices in water environments*, 1-137. DOI: 10.1007/978-3-642-32223-5_1
- Mounier, S., Patel, N., Quilici, L., Benaim, J. Y., & Benamou, C. (1999). Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve amazone:(Three-dimensional fluorescence of the dissolved organic carbon in the Amazon river). *Water Research*, 33(6), 1523-1533. DOI : 10.1016/S0043-1354(98)00347-9
- Moutin, T. (2000). Cycle biogéochimique du phosphate: rôle dans le contrôle de la production planctonique et conséquences sur l'exportation de carbone de la couche éclairée vers l'océan profond. *Océanis: Série de documents océanographiques*, 26(4), 643-660. hal-02179134

- Munawar, M., Thomas, R. L., Norwood, W., & Mudroch, U. A. (1985). Toxicity of Detroit River sediment-bound contaminants to ultraplankton. *Journal of Great Lakes Research*, 11(3), 264-274. DOI: 10.1016/S0380-1330(85)71769-8
- Munson-McGee, J. H., Lindsay, M. R., Sintes, E., Brown, J. M., D'Angelo, T., Brown, J., ... & Stepanauskas, R. (2022). Decoupling of respiration rates and abundance in marine prokaryoplankton. *Nature*, 612(7941), 764-770. DOI: 10.1038/s41586-022-05505-3
- Murphy, E. M., & Zachara, J. M. (1995). The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Geoderma*, 67(1-2), 103-124. DOI: 10.1016/0016-7061(94)00055-F
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., & Bro, R. (2013) Fluorescence soectometry and multi-way techniques. PARAFAC. *Anal. Methods*, 5, 6557. DOI: 10.1039/C3AY41160E
- Murrell, M. C., & Hollibaugh, J. T. (1998). Microzooplankton grazing in northern San Francisco Bay measured by the dilution method. *Aquatic Microbial Ecology*, 15(1), 53-63. DOI: 10.3354/ame011553
- Nagata, T. (2000). Production mechanisms of dissolved organic matter. In: D. L. Kirchman, *Microbial Ecology of Oceans*, 121-152. Wiley-Liss.
- Nausch, M., & Nausch, G. (2004). Bacterial utilization of phosphorus pools after nitrogen and carbon amendment and its relation to alkaline phosphatase activity. *Aquatic Microbial Ecology*, 37(3), 237-245. DOI: 10.3354/ame037237
- Navarro, E., Santinelli, C., Retelletti Brogi, S., Durrieu, G., Radakovitch, O., Garnier, C., & Misson, B. (2023). Prokaryotic Responses to Estuarine Coalescence Contribute to Planktonic Community Assembly in a Mediterranean Nutrient-Rich Estuary. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(5), 933. DOI: 10.3390/jmse11050933
- Nayar, S., Goh, B. P. L., & Chou, L. M. (2004). Environmental impact of heavy metals from dredged and resuspended sediments on phytoplankton and bacteria assessed in in situ mesocosms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(3), 349-369. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2003.08.015

- Nebbioso, A., & Piccolo, A. (2013). Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405, 109-124. DOI: 10.1007/s00216-012-6363-2
- Nebe-von-Caron, G., Stephens, P. J., Hewitt, C. J., Powell, J. R., & Badley, R. A. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of microbiological methods*, 42(1), 97-114. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00181-0
- Neddermann, K., & Nausch, M. (2004). The seasonality of stimulation of alkaline phosphatase activity by organic and inorganic nitrogen. *Aquat. Ecol.*, 38, 475-484. DOI: 10.1007/s10452-004-5666-6
- Needham, D. M., Sachdeva, R., & Fuhrman, J. A. (2017). Ecological dynamics and co-occurrence among marine phytoplankton, bacteria and myoviruses shows microdiversity matters. *The ISME journal*, 11(7), 1614-1629. DOI: 10.1038/ismej.2017.29
- Nelson, N. B., Carlson, C. A., & Steinberg, D. K. (2004). Production of chromophoric dissolved organic matter by Sargasso Sea microbes. *Marine Chemistry*, 89(1-4), 273-287. DOI: 10.1016/j.marchem.2004.02.017
- Nelson, N. B., & Siegel, D. A. (2013). The global distribution and dynamics of chromophoric dissolved organic matter. *Annual review of marine science*, 5, 447-476. DOI: 10.1146/annurev-marine-120710-100751
- Nelson, C. E., & Wear, E. K. (2014). Microbial diversity and the lability of dissolved organic carbon. *Proceedings of the national academy of sciences*, 111(20), 7166-7167. DOI: 10.1073/pnas.1405751111
- Neumann, A. M., Balmonte, J. P., Berger, M., Giebel, H. A., Arnosti, C., Voget, S., Simon, M., Brinkhoff, T., & Wietz, M. (2015). Different utilization of alginate and other algal polysaccharides by marine *Alteromonas macleodii* ecotypes. *Environmental microbiology*, 17(10), 3857-3868. DOI: 10.1111/1462-2920.12862

- Ni, C., Horton, D. J., Rui, J., Henson, M. W., Jiang, Y., Huang, X., & Learman, D. R. (2016). High concentrations of bioavailable heavy metals impact freshwater sediment microbial communities. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1003-1012. DOI: 10.1007/s13213-015-1189-8
- Nicholls, R. J., Wong, P. P., Burkett, V., Codignotto, J., Hay, J., McLean, R., ... & Saito, Y. (2007). Coastal systems and low-lying areas.
- Nicolau, R. (2005). Caractérisation et quantification des transferts dus aux petites rivières côtières Méditerranéennes (Doctoral dissertation, Université du Sud Toulon Var).
- Nicolau, R., Lucas, Y., Merdy, P., & Raynaud, M. (2012). Base flow and stormwater net fluxes of carbon and trace metals to the Mediterranean Sea by an urbanized small river. *Water Research*, 46(20), 6625-6637. DOI: 10.1016/j.watres.2012.01.031
- Nieto-Cid, M., Alvarez-Salgado, X. A. A', Gago, J., & Perez, F. F. (2005). DOM fluorescence, a tracer for biogeochemical processes in a coastal upwelling system (NW Iberian Peninsula). *Marine Ecology Progress Series*. 297, 33–50. DOI: 10.3354/meps297033
- Nieto-Cid, M., Alvarez-Salgado, X. A. A', & Perez, F. F. (2006). Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system. *Limnol. Oceanogr.*, 51(3), 1391-1400. DOI: 10.4319/lo.2006.51.3.1391
- Obernosterer, I., Reitner, B., & Herndl, G. J. (1999). Contrasting effects of solar radiation on dissolved organic matter and its bioavailability to marine bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 44(7), 1645-1654. DOI: 10.4319/lo.1999.44.7.1645
- Obernosterer, I., Kawasaki, N., & Benner, R. (2003). P-limitation of respiration in the Sargasso Sea and uncoupling of bacteria from P-regeneration in size-fractionation experiments. *Aquatic Microbial Ecology*, 32(3), 229-237. DOI: 10.3354/ame032229
- Odum, E. P. (1969). The Strategy of Ecosystem Development: An understanding of ecological succession provides a basis for resolving man's conflict with nature. *Science*, 164(3877), 262-270. DOI: 10.1126/science.164.3877.262

- Ogawa, K., Tsubono, Y., Nishino, Y., Watanabe, Y., Ohkubo, T., Watanabe, T., ... & Hisamichi, S. (1999). Inter-and intra-individual variation of food and nutrient consumption in a rural Japanese population. *European journal of clinical nutrition*, 53(10), 781-785. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1600845
- Olsen, J. V., de Godoy, L. M., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., ... & Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & cellular proteomics*, 4(12), 2010-2021. DOI: 10.1074/mcp.T500030-MCP200
- Paix, B., Layglon, N., Le Poupon, C., D'onofrio, S., Misson, B., Garnier, C., ... & Briand, J. F. (2021). Integration of spatio-temporal variations of surface metabolomes and epibacterial communities highlights the importance of copper stress as a major factor shaping host-microbiota interactions within a Mediterranean seaweed holobiont. *Microbiome*, 9, 1-19. DOI: 10.1186/s40168-021-01124-8
- Parada, A. E., Needham, D. M., 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, DOI: 10.1111/1462-2920.13023 (2016).
- Parinos, C., Gogou, A., Bouloubassi, I., Pedrosa-Pàmies, R., Hatzianestis, I., Sanchez-Vidal, A., ... & Lykousis, V. (2013). Occurrence, sources and transport pathways of natural and anthropogenic hydrocarbons in deep-sea sediments of the eastern Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 10(9), 6069-6089. DOI: 10.5194/bg-10-6069-2013
- Parlanti, E., Belin, C., Texier, H., Ewald, M., & Lamotte, M. (1997). Interpretation of the fluorescence signature of the marine and continental waters in the Gironde and Seine estuaries. *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and in Environmental Protection*, 603-609.
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., & Lamotte, M. (2000). Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic geochemistry*, 31(12), 1765-1781. DOI: 10.1016/S0146-6380(00)00124-8

- Parlanti, E., Morin, B., & Vacher, L. (2002). Combined 3D-spectrofluorometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Organic geochemistry*, 33(3), 221-236. DOI: 10.1016/S0146-6380(01)00154-1
- Pedler, B. E., Aluwihare, L. I., & Azam, F. (2014). Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. *PNAS*, 111(20), 7202-7207. DOI: 10.1073/pnas.1401887111
- Percuoco, V. P., Kalnejais, L. H., & Officer, L. V. (2015). Nutrient release from the sediments of the Great Bay Estuary, NH USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 161, 76-87. DOI : 10.1016/j.ecss.2015.04.006
- Pernet-Coudrier, B., Clouzot, L., Varrault, G., Tusseau-Vuillemin, M. H., Verger, A., & Mouchel, J. M. (2008). Dissolved organic matter from treated effluent of a major wastewater treatment plant: Characterization and influence on copper toxicity. *Chemosphere*, 73(4), 593-599. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.05.064.
- Perry, M. J. (1972). Alkaline phosphatase activity in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Marine Biology*, 15, 113-119. DOI: 10.1007/BF00353639
- Perry, R. H., Cooks, R. G., & Noll, R. J. (2008). Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 661-699. DOI: 10.1002/mas.20186
- Pianka, E. R. (1970). On r-and K-selection. *The american naturalist*, 104(940), 592-597.
- Pinhassi, J., Montserrat M. S., Havskum, H., Peters, F., Guadayol, Ò., Malits, A., & Marrasé, C. (2004). Changes in Bacterioplankton Composition under Different Phytoplankton Regimens. *ASM J.*, 70(11). DOI: 10.1128/AEM.70.11.6753-6766.2004
- Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., Alonso-Sáez, L., Montserrat M. S., Montserrat, V., Pedrós-Alió, C., & Gasol, J. L. (2006). Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. *AME*, 44(3), 241-252. DOI: 10.3354/ame044241

- Pirt S. J. (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures proceedings of the royal society of London. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 163, 224–231. DOI: 10.1098/rspb.1965.0069
- Pitta, P., Nejstgaard, J. C., Tsagaraki, T. M., Zervoudaki, S., Egge, J. K., Frangoulis, C., ... & Thingstad, T. F. (2016). Confirming the “Rapid phosphorus transfer from microorganisms to mesozooplankton in the Eastern Mediterranean Sea” scenario through a mesocosm experiment. *Journal of Plankton Research*, 38(3), 502-521. DOI: 10.1093/plankt/fbw010
- Podgorski, D. C., Hamdan, R., McKenna, A. M., Nyadong, L., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., & Cooper, W. T. (2012). Characterization of pyrogenic black carbon by desorption atmospheric pressure photoionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 84(3), 1281-1287. DOI: 10.1021/ac202166x
- Polz, M. F., Hunt, D. E., Preheim, S. P., & Weinreich, D. M. (2006). Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Phil. Trans. R. Soc.*, 361, 2009–2021. DOI: 10.1098/rstb.2006.1928
- Pomeroy, L. R., & Wiebe, W. J. (2001). Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, 23, 187-203. DOI: 10.3354/ame023187
- Pomeroy, L. R., & Deibel, D. O. N. (1986). Temperature regulation of bacterial activity during the spring bloom in Newfoundland coastal waters. *Science*, 233(4761), 359-361. DOI: 10.1126/science.233.4761.359
- Pomeroy, L. R., Wiebe, W. J., Deibel, D., Thompson, R. J., Rowe, G. T., & Pakulski, J. D. (1991). Bacterial responses to temperature and substrate concentration during the Newfoundland spring bloom. *Marine Ecology Progress Series*, 143-159. <https://www.jstor.org/stable/24825851>
- Pörtner, H. O., Karl, D. M., Boyd, P. W., Cheung, W., Lluch-Cota, S. E., Nojiri, Y., ... & Wittmann, A. C. (2014). Ocean systems. In *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. contribution of working group II to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change* (pp. 411-484). Cambridge University Press.

- Pouget, F., Schäfer, J., Dutruch, L., Garnier, C., Tessier, E., Dang, D. H., & Blanc, G. (2014). Sources and historical record of tin and butyl-tin species in a Mediterranean bay (Toulon Bay, France). *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 6640-6651. DOI: 10.1007/s11356-014-2576-6
- Pringault, O., Lafabrie, C., Avezac, M., Bancon-Montigny, C., Carre, C., Chalghaf, M., ... & Bouvy, M. (2016). Consequences of contaminant mixture on the dynamics and functional diversity of bacterioplankton in a southwestern Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere*, 144, 1060-1073. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.093
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188–7196. DOI: 10.1093/nar/gkm864
- Psarra, S., Tselepides, A., & Ignatiades, L. (2000). Primary productivity in the oligotrophic Cretan Sea (NE Mediterranean): seasonal and interannual variability. *Progress in Oceanography*, 46(2-4), 187-204. DOI: 10.1016/S0079-6611(00)00018-5
- Psarra, S., Zohary, T., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Polychronaki, T., Stambler, N., ... & Thingstad, T. F. (2005). Phytoplankton response to a Lagrangian phosphate addition in the Levantine Sea (Eastern Mediterranean). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 52(22-23), 2944-2960. DOI: 10.1016/j.dsr2.2005.08.015
- Pujo-Pay, M., & Conan, P. (2003). Seasonal variability and export of dissolved organic nitrogen in the northwestern Mediterranean Sea. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 108(C6). DOI: 10.1029/2000JC000368
- Qin, B., Hu, W., Gao, G., Luo, L., & Zhang, J. (2004). Dynamics of sediment resuspension and the conceptual schema of nutrient release in the large shallow Lake Taihu, China. *Chinese Science Bulletin*, 49, 54-64. DOI: 10.1007/BF02901743
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Research*, 41, 590–596. DOI: 10.1093/nar/gks1219

- Rabouille, C., Mackenzie, F. T., & Ver, L. M. (2001). Influence of the human perturbation on carbon, nitrogen, and oxygen biogeochemical cycles in the global coastal ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(21), 3615-3641. DOI: 10.1016/S0016-7037(01)00760-8
- Raimbault, P., Pouvesle, W., Diaz, F., Garcia, N., & Sempéré R. (1999). Wet-oxidation and automated colorimetry for simultaneous determination of organic carbon, nitrogen and phosphorus dissolved in seawater. *Marine Chemistry*, 66, 161-169. DOI: 10.1016/S0304-4203(99)00038-9
- Rawn, D. F., Lockhart, W. L., Wilkinson, P., Savoie, D. A., Rosenberg, G. B., & Muir, D. C. (2001). Historical contamination of Yukon Lake sediments by PCBs and organochlorine pesticides: influence of local sources and watershed characteristics. *Science of the Total Environment*, 280(1-3), 17-37. DOI: 10.1016/S0048-9697(01)00798-7
- Reddy, K. R., Fisher, M. M., & Ivanoff, D. (1996). Resuspension and diffusive flux of nitrogen and phosphorus in a hypereutrophic lake (Vol. 25, No. 2, pp. 363-371). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. DOI: 10.2134/jeq1996.00472425002500020022x
- Redfield, A. C. (1934). On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton(Vol. 1). Liverpool: university press of liverpool.
- Repeta, D. J. (2015). Chemical characterization and cycling of dissolved organic matter. In *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter* (pp. 21-63). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-405940-5.00002-9
- Repeta, D. J. (2021). Unifying chemical and biological perspectives of carbon accumulation in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 118, e2100935118. DOI: 10.1073/pnas.2100935118
- Retelletti Brogi, S., Charrière, B., Gonnelli, M., Vaultier, F., Sempéré, R., Vesti, S., Santinelli, C. (2020). Effect of uv and visible radiation on optical properties of chromophoric dissolved organic matter released by *emiliana huxleyi*. *J. Mar. Sci. Eng.*, 8, 888. DOI : 10.3390/jmse8110888

- Retelletti Brogi, S., Casotti, R., Misson, B., Balestra, C., Gonnelli, M., Vestri, S., Santinelli, C. (2021). DOM biological lability in an estuarine system in two contrasting periods. *Marine Science and Engineering*, 9(2), 172. DOI: 10.3390/jmse9020172
- Rhein, M., Rintoul, S. R., Aoki, S., Campos, E., Chambers, D., Feely, R. A., ... & Midgley, P. M. (2013). Observations: Ocean in Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 255-316.
- Rinnan, R., & Rinnan, Å. (2007). Application of near infrared reflectance (NIR) and fluorescence spectroscopy to analysis of microbiological and chemical properties of arctic soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1664-1673. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.01.022
- Ritzrau, W., & Graf, G. (1992). Increase of microbial biomass in the benthic turbidity zone of Kiel Bight after resuspension by a storm event. *Limnology and Oceanography*, 37(5), 1081-1086. DOI: 10.4319/lo.1992.37.5.1081
- Rivas-Ubach, A., Liu, Y., Bianchi, T. S., Tolić, N., Jansson, C., & Paša-Tolić, L. (2018) Moving beyond the van Krevelen Diagram: A New Stoichiometric Approach for Compound Classification in Organisms. *Anal. Chem.*, 90(10), 6152–6160. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00529
- Robarts, R.D. Incorporation of Radioactive Precursors Into Macromolecules as Measures of Bacterial Growth: Problems and Pitfalls. In: Cooksey, K.E. (eds) *Molecular Approaches to the Study of the Ocean*. Springer, 1998, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-011-4928-0_25
- Rochelle-Newall, E. J. (1999). Dynamics of chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in experimental mesocosms. *International Journal of Remote Sensing*, 20(3), 627-641. DOI: 10.1080/014311699213389
- Rodellas, V., Roca-Martí, M., Puigcorbé, V., Castrillejo, M., & Casacuberta, N. (2023). Radionuclides as Ocean Tracers, in: Blasco, J., Tovar-Sánchez, A. (Eds.), *Marine Analytical Chemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 199-273. DOI: 10.1007/978-3-031-14486-8_4

- Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). The physiology and ecological implications of efficient growth. *International Society for Microbial Ecology*, 9, 1481-1487. DOI: 10.1038/ismej.2014.235
- Romagnan, J. B., Legendre, L., Guidi, L., Jamet, J. L., Jamet, D., Mousseau, L., ... & Stemmann, L. (2015). Comprehensive model of annual plankton succession based on the whole-plankton time series approach. *PLoS One*, 10(3), e0119219. DOI: 10.1371/journal.pone.0119219
- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Alvarez-Salgado, X. A., Gasol, J. M., & Marrase, C. (2010). Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 55, 446–454. DOI: 10.4319/lo.2010.55.1.0446
- Rouessac, F., Rouessac, A., & Daniel Cruch. (2004). *Analyse chimique*. Dunod.
- Russell, J. B., & Cook, G. M. (1995). Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.*, 59, 48-62. DOI: 10.1128/mr.59.1.48-62.1995
- Saar, R. A., & Weber, J. H. (1980). Comparison of spectrofluorometry and ion-selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy-metal ions. *Analytical Chemistry*, 52(13), 2095-2100.
- Sabine, C. L., & Feely, R. A. (2007). The oceanic sink for carbon dioxide. In *Greenhouse gas sinks* (pp. 31-49). Wallingford UK: CABI. DOI: 10.1079/9781845931896.0031
- Sachse, A., Henrion, R., Gelbrecht, J., & Steinberg, C. E. W. (2005). Classification of dissolved organic carbon (DOC) in river systems: influence of catchment characteristics and autochthonous processes. *Organic Geochemistry*, 36(6), 923-935. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2004.12.008
- Saifuddin M., Bhatnagar J.M., Segrè D., & Finzi A.C. (2019). Microbial carbon use efficiency predicted from genome- scale metabolic models. *Nature Communications*, 10, 3568. DOI: 10.1038/s41467-019-11488-z

- Saliot, A., Tronczynski, J., Scribe, P., & Letolle, R. (1988). The application of isotopic and biogeochemical markers to the study of the biochemistry of organic matter in a macrotidal estuary, the Loire, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 27(6), 645-669. DOI: 10.1016/0272-7714(88)90073-X
- Santinelli, C., Nannicini, L., & Seritti, A. (2010). DOC dynamics in the meso and bathypelagic layers of the Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(16), 1446-1459. DOI: 10.1016/j.dsr2.2010.02.014
- Santinelli, C. (2015). Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter || DOC in the Mediterranean Sea. 579–608. DOI: 10.1016/b978-0-12-405940-5.00013-3
- Santinelli, C. (2020). Dissolved Organic Carbon Dynamics in the Ligurian Sea. *The Mediterranean Sea in the Era of Global Change 2: 30 Years of Multidisciplinary Study of the Ligurian Sea*, 1-30. DOI: 10.1002/9781119704782.ch1
- Šantl-Temkiv, T., Finster, K., Dittmar, T., Hansen, B. M., Thyrhaug, R., Nielsen, N. W., & Karlson, U. G. (2013). Hailstones: a window into the microbial and chemical inventory of a storm cloud. *PloS one*, 8(1), e53550. DOI: 10.1371/journal.pone.0053550
- Sanyal, P., Ray, R., Paul, M., Gupta, V. K., Acharya, A., Bakshi, S., ... & Mukhopadhyay, S. K. (2020). Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in the coastal environments dominated by mangroves, Indian Sundarbans. *Frontiers in Earth Science*, 8, 218. DOI: 10.3389/feart.2020.00218
- Sarmiento, J. L., & Gruber, N. (2002). Sinks for anthropogenic carbon. *Physics today*, 55(8), 30-36. DOI: 10.1063/1.1510279
- Schweitzer B., & Simon M. (1995) Growth limitation of planktonic bacteria in a large mesotrophic lake. *Microbial Ecology*, 30, 89 – 104.
- Seidel, M., Dittmar, T., Ward, N. D., Krusche, A. V., Richey, J. E., Yager, P. L., & Medeiros, P. M. (2016). Seasonal and spatial variability of dissolved organic matter composition in the lower Amazon River. *Biogeochemistry*, 131, 281-302. DOI: 10.1007/s10533-016-0279-4

- Seitzinger, S. P., & Sanders, R. W. (1999). Atmospheric inputs of dissolved organic nitrogen stimulate estuarine bacteria and phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 44(3), 721-730. DOI: 10.4319/lo.1999.44.3.0721
- Sempere, R., Charrière, B., Van Wambeke, F., & Cauwet, G. (2000). Carbon inputs of the Rhône River to the Mediterranean Sea: Biogeochemical implications. *Global Biogeochemical Cycles*, 14(2), 669-681. DOI: 10.1029/1999GB900069
- Shen, Q., Dai, Z., Huang, Y. W., & Cheung, H. Y. (2016). Lipidomic profiling of dried seahorses by hydrophilic interaction chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*, 205, 89-96. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.151.
- Shen, Y., & Benner, R. (2020). Molecular properties are a primary control on the microbial utilization of dissolved organic matter in the ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 65(5), 1061-1071. DOI: 10.1002/lno.11369
- Shen, Y., & Benner, R. (2022). Reply to comment: Controls on turnover of marine dissolved organic matter—testing the null hypothesis of purely concentration-driven uptake. *Limnology and Oceanography*, 67(3), 680-683. DOI: 10.1002/lno.12026
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., Caron, D. A., Vault, D., & Worden, A. Z. (2007). Oceanic protists. *Oceanography*, 20(2), 130-134. <https://www.jstor.org/stable/24860052>
- Shiah, F. K., & Ducklow, H. W. (1994). Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Marine Ecology-Progress Series*, 103, 297-297. DOI: 10.4319/lo.1994.39.6.1243
- Shiah, F. K., & Ducklow, H. W. (1995). Multiscale variability in bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in a temperate salt-marsh tidal creek. *Limnology and oceanography*, 40(1), 55-66. DOI: 10.4319/lo.1995.40.1.0055
- Shinada, A., Ikeda, T., Ban, S., & Tsuda, A. (2000). Seasonal changes in micro-zooplankton grazing on phytoplankton assemblages in the Oyashio region. *Plankton Biol Ecol*, 47(2), 85-92.

- Siegel, D. A., Maritorena, S., Nelson, N. B., Behrenfeld, M. J., & McClain, C. R. (2005). Colored dissolved organic matter and its influence on the satellite-based characterization of the ocean biosphere. *Geophysical Research Letters*, 32(20). DOI: 10.1029/2005GL024310
- Sigman, D. M., & Boyle, E. A. (2000). Glacial/interglacial variations in atmospheric carbon dioxide. *Nature*, 407(6806), 859-869. DOI: 10.1038/35038000
- Silva, L., Calleja, M. L., Huete-Stauffer, T. M., Ivetic, S., Ansari, M. I., Viegas, M., & Morán, X. A. G. (2019). Low abundances but high growth rates of coastal heterotrophic bacteria in the Red Sea. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3244. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03244
- Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera d'Alcalá, M., Vaqué, D., & Zingone, A. (2010). Plankton in the open Mediterranean Sea: a review. *Biogeosciences*, 7(5), 1543-1586. DOI: 10.5194/bg-7-1543-2010
- Soetaert, K., & Middelburg, J. J. (2009). Modeling eutrophication and oligotrophication of shallow-water marine systems: the importance of sediments under stratified and well-mixed conditions. In *Eutrophication in Coastal Ecosystems: Towards better understanding and management strategies Selected Papers from the Second International Symposium on Research and Management of Eutrophication in Coastal Ecosystems, 20–23 June 2006, Nyborg, Denmark (239-254)*. Springer Netherlands.
- Sohrin, R., & Sempéré, R. (2005). Seasonal variation in total organic carbon in the northeast Atlantic in 2000–2001. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 110(C10). DOI: 10.1029/2004JC002731
- Sommer, U., Adrian, R., De Senerpont Domis, L., Elser, J. J., Gaedke, U., Ibelings, B., ... & Winder, M. (2012). Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) model: mechanisms driving plankton succession. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 43, 429-448. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-110411-160251
- Søndergaard, M., Williams, P. J. L. B., Cauwet, G., Riemann, B., Robinson, C., Terzic, S., ... & Worm, J. (2000). Net accumulation and flux of dissolved organic carbon and dissolved organic nitrogen in marine plankton communities. *Limnology and Oceanography*, 45(5), 1097-1111. DOI: 10.4319/lo.2000.45.5.1097

- Song, H.K., Song, W., Kim, M., Tripathi, B.M., Kim, H., Jablonski, P., & Adams, J.M. (2017). Bacterial strategies along nutrient and time gradients, revealed by metagenomic analysis of laboratory microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 1-13. DOI: 10.1093/femsec/fix114
- Souvermezoglou, E., Hatzigeorgiou, E., Pampidis, I., & Siapsali, K. (1992). Distribution and seasonal variability of nutrients and dissolved-oxygen in the northeastern ionian sea. *Oceanologica Acta*, 15(6), 585-594. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00101/21183/>
- Spaak, G. (2014). Investigating the potential of dissolved organic matter (DOM) induced denitrification in Dutch groundwater (Master's thesis).
- Stach, J. E., Bathe, S., Clapp, J. P., & Burns, R. G. (2001). PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 139-151. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00834.x
- Stearns, S. C. (1977). The evolution of life history traits: a critique of the theory and a review of the data. *Annual review of ecology and systematics*, 8(1), 145-171. DOI: 10.1146/annurev.es.08.110177.001045
- Stedmon, C. A., Markager, S., & Bro, R. (2003). Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine chemistry*, 82(3-4), 239-254. DOI: 10.1016/S0304-4203(03)00072-0
- Stedmon, C. A., & Markager, S. (2005). Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 50(5), 1415-1426. DOI: 10.4319/lo.2005.50.5.1415
- Stedmon, C. A., Thomas, D. N., Granskog, M., Kaartokallio, H., Papadimitriou, S., & Kuosa, H. (2007). Characteristics of dissolved organic matter in Baltic coastal sea ice: allochthonous or autochthonous origins?. *Environmental Science & Technology*, 41(21), 7273-7279. DOI: 10.1021/es071210f
- Stedmon, C. A., & Bro, R. (2008). Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 6, 572-579. DOI: 10.4319/lom.2008.6.572

- Stedmon, C., & Álvarez-Salgado, X. A. (2011). Shedding light on a black box: UV–visible spectroscopic characterization of marine dissolved organic matter. *American Association for the Advancement of Science*. DOI: 10.1126/science.opms.sb0001
- Stedmon, C. A., Thomas, D. N., Papadimitriou, S., Granskog, M. A., & Dieckmann, G. S. (2011). Using fluorescence to characterize dissolved organic matter in Antarctic sea ice brines. *J. Geophys. Research*, 116. DOI: 10.1029/2011JG001716
- Stedmon, C. A., & Cory, R. M. (2014). Biological origins and fate of fluorescent dissolved organic matter in aquatic environments. *Aquatic organic matter fluorescence*, 278-299.
- Stedmon, C. A., & Nelson, N. B. (2015). The optical properties of DOM in the ocean. In *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter* (pp. 481-508). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-405940-5.00010-8
- Stenson, A. C., Landing, W. M., Marshall, A. G., & Cooper, W. T. (2002). Ionization and fragmentation of humic substances in electrospray ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(17), 4397-4409. DOI: 10.1021/ac020019f
- Stenson, A. C., Marshall, A. G., & Cooper, W. T. (2003). Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. *Analytical chemistry*, 75(6), 1275-1284. DOI: 10.1021/ac026106p
- Stocker, R. (2012). Marine microbes see a sea of gradients. *Science*, 338(6107), 628-633. DOI: 10.1126/science.1208929
- Stouthamer, A. H., & Bettenhausen, C. (1973). Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, 301, 53-70. DOI: 10.1016/0304-4173(73)90012-8
- Scully, N. M., Tranvik, L. J., & Cooper, W. J. (2003). Photochemical effects on the interaction of enzymes and dissolved organic matter in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 48(5), 1818-1824. DOI: 10.4319/lo.2003.48.5.1818

- Sun, Y., & Torgersen, T. (1998). Rapid and precise measurement method for adsorbed ²²⁴Ra on sediments. *Marine chemistry*, 61(3-4), 163-171. DOI: 10.1016/S0304-4203(98)00016-4
- Sun, M. Y., Aller, R. C., Lee, C., & Wakeham, S. G. (2002). Effects of oxygen and redox oscillation on degradation of cell-associated lipids in surficial marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(11), 2003-2012. DOI: 10.1016/S0016-7037(02)00830-X
- Sun, J., Steindler, L., Thrash, J. C., Halsey, K. H., Smith, D. P., Carter, A. E., ... & Giovannoni, S. J. (2011). One carbon metabolism in SAR11 pelagic marine bacteria. *PloS one*, 6(8), e23973. DOI: 10.1371/journal.pone.0023973
- Sun, M. Y., Dafforn, K. A., Johnston, E. M., & Brown, M. V. (2013). Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environmental Microbiology*, 15(9), 2517-2531. DOI: 10.1111/1462-2920.12133
- Sunagawa, S., Coelho, L. P., Chaffron, S., Kultima, J. R., Labadie, K., Salazar, G., ... & Velayoudon, D. (2015). Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348(6237), 1261359. DOI: 10.1126/science.1261359
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature reviews microbiology*, 5(10), 801-812. DOI: 10.1038/nrmicro1750
- Tailhades, B. (2012). Hérault: une économie présentielle, dynamisée par la croissance démographique et le tourisme. INSEE Repères synthèse pour l'économie du Languedoc-Roussillon, (3), 8.
- Takasu, H., Uchino, K., & Mori, K. (2020). Dissolved and particulate organic matter dynamics relative to sediment resuspension induced by the tidal cycle in macrotidal estuaries, Kyushu, Japan. *Water*, 12(9), 2561. DOI: 10.3390/w12092561
- Tanaka, T., Thingstad, T. F., Gasol, J. M., Cardelús, C., Jezbera, J., Sala, M. M., ... & Unrein, F. (2009). Determining the availability of phosphate and glucose for bacteria in P-limited mesocosms of NW Mediterranean surface waters. *Aquatic microbial ecology*, 56(1), 81-91. DOI: 10.3354/ame01314

- Tang, K., Jiao, N., Liu, K., Zhang, Y., & Li, S. (2012). Distribution and Functions of TonB-Dependent Transporters in Marine Bacteria and Environments: Implications for Dissolved Organic Matter Utilization. *PLoS ONE*, 7(7), e41204. DOI: 10.1371/journal.pone.0041204
- Tedetti, M., & Sempéré, R. (2006). Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. A review. *Photochemistry and photobiology*, 82(2), 389-397. DOI: 10.1562/2005-11-09-IR-733
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C. M., ... & Amann, R. (2012). Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 336(6081), 608-611. DOI: 10.1126/science.1218344
- Teira, E., Logares, R., Gutiérrez-Barral, A., Ferrera, I., Varela, M. M., Morán, X. A. G., & Gasol, J. M. (2019). Impact of grazing, resource availability and light on prokaryotic growth and diversity in the oligotrophic surface global ocean. *Environmental microbiology*, 21(4), 1482-1496. DOI: 10.1111/1462-2920.14581
- Tessier, E., Garnier, C., Mullet, J. U., Lenoble, V., Arnaud, M., Raynaud, M., & Mounier, S. (2011). Study of the spatial and historical distribution of sediment inorganic contamination in the Toulon bay (France). *Marine Pollution Bulletin*, 62(10), 2075-2086. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.07.022
- Tett, P., & Wilson, H. (2000). From biogeochemical to ecological models of marine microplankton. *Journal of Marine Systems*, 25(3-4), 431-446. DOI: 10.1016/S0924-7963(00)00032-4
- The MerMex Group, de Madron, X. D., Guieu, C., Sempéré, R., Conan, P., Cossa, D., ... & Verney, R. (2011). Marine ecosystems' responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Progress in Oceanography*, 91(2), 97-166. DOI: 10.1016/j.pocean.2011.02.003
- Thingstad, T. F., & Rassoulzadegan, F. (1995). Nutrient limitations, microbial food webs and 'biological C-pumps': suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 299-306. <https://www.jstor.org/stable/44634840>

- Thingstad, T. F., & Lignell, R. (1997). Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic microbial ecology*, 13(1), 19-27. DOI: 10.3354/ame013019
- Thingstad, T. F., Hagström, Å., & Rassoulzadegan, F. (1997). Accumulation of degradable DOC in surface waters: Is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnol. Oceanogr.*, 42, 398-404. DOI: 10.4319/lo.1997.42.2.0398
- Thingstad, T. F., Zweifel, U. L., & Rassoulzadegan, F. (1998). P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43(1), 88-94. DOI: 10.4319/lo.1998.43.1.0088
- Thingstad, T. F. (2003). Physiological models in the context of microbial food webs. In *Aquatic ecosystems* (pp. 383-397). Academic press. DOI: 10.1016/B978-012256371-3/50017-2
- Thingstad, T. F., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Flaten, G. F., Groom, S., Herut, B., & Zohary, T. (2005). Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean. *Science*, 309(5737), 1068-1071. DOI: 10.1126/science.1112632
- Thingstad, T. F., Bellerby, R. G. J., Bratbak, G., Børsheim, K. Y., Egge, J. K., Heldal, M., ... & Töpper, B. (2008). Counterintuitive carbon-to-nutrient coupling in an Arctic pelagic ecosystem. *Nature*, 455(7211), 387-390. DOI: 10.1038/nature07235
- Thingstad, T. F., & Aksnes, D. L. (2019). Why growth of nutrient-limited micro-organisms should have low-temperature sensitivity. *The ISME journal*, 13(2), 557-558. DOI: 10.1038/s41396-018-0271-1
- Thomas, H., Bozec, Y., Elkalay, K., & De Baar, H. J. (2004). Enhanced open ocean storage of CO₂ from shelf sea pumping. *Science*, 304(5673), 1005-1008. DOI: 10.1126/science.1095491
- Thornton, D. C. (2014). Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. *European Journal of Phycology*, 49(1), 20-46. DOI: 10.1080/09670262.2013.875596

- Timko, S. A., Gonsior, M., & Cooper, W. J. (2015). Influence of pH on fluorescent dissolved organic matter photo-degradation. *Water research*, 85, 266-274. DOI: 10.1016/j.watres.2015.08.047
- Tolić, N., Liu, Y., Liyu, A., Shen, Y., Tfaily, M. M., Kujawinski, E. B., ... & Hess, N. J. (2017). Formularity: software for automated formula assignment of natural and other organic matter from ultrahigh-resolution mass spectra. *Analytical chemistry*, 89(23), 12659-12665. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03318
- Torréton, J. P., Talbot, V., & Garcia, N. (2000). Nutrient stimulation of bacterioplankton growth in Tuamotu atoll lagoons. *Aquatic Microbial Ecology*, 21(2), 125-137. DOI: 10.3354/ame021125
- Tranvik, L. J., & Bertilsson, S. (2001). Contrasting effects of solar UV radiation on dissolved organic sources for bacterial growth. *Ecology Letters*, 4(5), 458-463. DOI : 10.1046/j.1461-0248.2001.00245.x
- Tréguer, P., & Le Corre, P. (1975). Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Laboratoire d'Océanographie Chimique, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 110.
- Tulonen, T., Salonen, K., & Arvola, L. (1992). Effects of different molecular weight fractions of dissolved organic matter on the growth of bacteria, algae and protozoa from a highly humic lake. *Dissolved Organic Matter in Lacustrine Ecosystems: Energy Source and System Regulator*, 239-252.
- Tziotis, D., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. (2011). Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. *European Journal of Mass Spectrometry*, 17(4), 415-421. DOI: 10.1255/ejms.1135
- United Nations Environment Programme/Mediterranean Action Plan and Plan Bleu (2020). State of the Environment and Development in the Mediterranean: Key Messages. Nairobi.

- Vacher, L. (2004). Étude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens: cas des estuaires de la Gironde et de la Seine (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).
- Valiela, I., Costa, J., Foreman, K., Teal, J. M., Howes, B., & Aubrey, D. (1990). Transport of groundwater-borne nutrients from watersheds and their effects on coastal waters. *Biogeochemistry*, 10, 177-197.
- Vallino, J. J., Hopkinson, C. S., & Hobbie, J. E. (1996). Modeling bacterial utilization of dissolved organic matter: optimization replaces Monod growth kinetics. *Limnology and Oceanography*, 41(8), 1591-1609. DOI: 10.4319/lo.1996.41.8.1591
- Van Wambeke, F., Christaki, U., Giannakourou, A., Moutin, T., & Souvemerzoglou, K. (2002). Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the mediterranean sea. *Microbial Ecology*, 43(1), 119–133. <http://www.jstor.org/stable/4287579>
- Van Wambeke, F., Bonnet, S., Moutin, T., Raimbault, P., Alarcón, G., & Guieu, C. (2008). Factors limiting heterotrophic bacterial production in the southern Pacific Ocean. *Biogeosciences*, 5(3), 833-845. DOI: 10.5194/bg-5-833-2008
- Vangriesheim, A., & Khripounoff, A. (1990). Near-bottom particle concentration and flux: temporal variations observed with sediment traps and nephelometer on the Meriadzek Terrace, Bay of Biscay. *Progress in Oceanography*, 24(1-4), 103-116. DOI: 10.1016/0079-6611(90)90023-U
- Veldhuis, M. J., & Kraay, G. W. (2000). Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives. *Scientia Marina*, 64(2), 121-134. DOI: 10.3989/scimar.2000.64n2121
- Verdugo, P., Alldredge, A. L., Azam, F., Kirchman, D. L., Passow, U., & Santschi, P. H. (2004). The oceanic gel phase: a bridge in the DOM–POM continuum. *Marine chemistry*, 92(1-4), 67-85. DOI: 10.1016/j.marchem.2004.06.017
- Vila-Costa, M., Cerro-Gálvez, E., Martínez-Varela, A., Casas, G., & Dachs, J. (2020). Anthropogenic dissolved organic carbon and marine microbiomes. *ISME Journal*, 14, 2646–2648. DOI: 10.1038/s41396-020-0712-5

- Villarreal-Chiu, J. F., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Frontiers in microbiology*, 3, 19. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00019
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., & Nebe-von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 429-448. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00549.x
- Volk, T., & Hoffert, M. I. (1985). Ocean carbon pumps: Analysis of relative strengths and efficiencies in ocean-driven atmospheric CO₂ changes. *The carbon cycle and atmospheric CO₂: Natural variations Archean to present*, 32, 99-110. DOI: 10.1029/GM032p0099
- Volk, C., Renner, C., Robert, C., & Joret, J. C. (1994). Comparison of two techniques for measuring biodegradable dissolved organic carbon in water. *Environmental Technology*, 15(6), 545-556. DOI: 10.1080/09593339409385460
- Wafu, E., Abou, L., Nicolay, A., Boissery, P., Garnier, C., & Portugal, H. (2017). Historical trends of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Toulon Bay (South of France). *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, 5(6), 150-158. DOI: 10.11648/j.ijema.20170506.11
- Wainright, S. C. (1987). Stimulation of heterotrophic microplankton production by resuspended marine sediments. *Science*, 238(4834), 1710-1712. DOI: 10.1126/science.238.4834.1710
- Walsh, J. J. (1991). Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. *Nature*, 350(6313), 53-55. DOI: 10.1038/350053a0
- Walker, B. D., Beaupre, S. R., Guilderson, T. P., Druffel, E. R. M., & McCarthy, M. D. (2011). Large-volume ultrafiltration for the study of radiocarbon signatures and size vs. age relationships in marine dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(18), 5187-5202. DOI: 10.1016/j.gca.2011.06.015
- Wollast, R. (1993). Interactions of carbon and nitrogen cycles in the coastal zone. In *Interactions of C, N, P and S biogeochemical cycles and global change* (pp. 195-210). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Watermann, B., & Eklund, B. (2019). Can the input of biocides and polymeric substances from antifouling paints into the sea be reduced by the use of non-toxic hard coatings? *Marine pollution bulletin*, 144, 146-151. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.059
- Weinbauer, M. G., Fritz, I., Wenderoth, D. F., & Höfle, M. G. (2002). Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1082-1087. DOI: 10.1128/AEM.68.3.1082-1087.2002
- Wen, Z., Song, K., Shang, Y., Lyu, L., Tao, H., & Liu, G. (2021). Natural and anthropogenic impacts on the DOC characteristics in the Yellow River continuum. *Environmental Pollution*, 287, 117231. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117231
- Westerhoff, H. V., Hellingwerf, K. J., & Van Dam, K. (1983). Thermodynamic efficiency of microbial growth is low but optimal for maximal growth rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(1), 305-309. DOI: 10.1073/pnas.80.1.305
- Wheeler, P. A., & Kirchman, D. L. (1986). Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems 1. *Limnology and Oceanography*, 31(5), 998-1009. DOI: 10.4319/lo.1986.31.5.0998
- White, P. A., Kalff, J., Rasmussen, J. B., & Gasol, J. M. (1991). The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microbial ecology*, 21, 99-118. DOI: 10.1007/BF02539147
- White, A. K., & Metcalf, W. W. (2007). Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 379-400. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093357
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583. DOI: 10.1073/pnas.95.12.6578
- Wieser, M. E., & Berglund, M. (2009). Weight of natural elements. *Pure. Appl. Chem.*, 81(11), 2131-2156. DOI: 10.1351/PAC-REP-10-09-14

- Wikner, J., Cuadros, R., & Jansson, M. (1999). Differences in consumption of allochthonous DOC under limnic and estuarine conditions in a watershed. *Aquatic Microbial Ecology*, 17, 289-299. DOI: 10.3354/ame017289
- Wikner, J., & Andersson, A. (2012). Increased freshwater discharge shifts the trophic balance in the coastal zone of the northern Baltic Sea. *Global Change Biology*, 18(8), 2509-2519. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2012.02718.x
- Wilson, H. F., & Xenopoulos, M. A. (2009). Effects of agricultural land use on the composition of fluvial dissolved organic matter. *Nature Geoscience*, 2(1), 37-41. DOI: 10.1038/ngeo391
- Witek, Z., Ochocki, S., Maciejowska, M., Pastuszak, M., Nakonieczny, J., Podgórska, B., ... & Wrzesinska-Kwiecien, M. (1997). Phytoplankton primary production and its utilization by the pelagic community in the coastal zone of the Gulf of Gdansk (southern Baltic). *Marine Ecology Progress Series*, 148, 169-186. DOI: 10.3354/meps148169
- Wu, M., Yang, F., Yao, Q., Bouwman, L., & Wang, P. (2020). Storm-induced sediment resuspension in the Changjiang River Estuary leads to alleviation of phosphorus limitation. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111628. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111628.
- Xu, Z., Cheung, S., Endo, H., Xia, X., Wu, W., Chen, B., Ho, N. H. E., Suzuki, K., Li, M., & Liu, H. (2022) Disentangling the Ecological Processes Shaping the Latitudinal Pattern of Phytoplankton Communities in the Pacific Ocean. *ASM J.*, 7(1). DOI: 10.1128/msystems.01203-21
- Yamashita, Y., & Tanoue, E. (2003). Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry*, 82(3-4), 255-271. DOI : 10.1016/S0304-4203(03)00073-2
- Yeber, D. M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., & Weinell, C. (2005). Reaction rate estimation of controlled-release antifouling paint binders: Rosin-based systems. *Progress in Organic Coatings*, 53(4), 256-275. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2005.03.008

- Yucel, N. (2018) Spatio-temporal variability of the size-fractionated primary production and chlorophyll in the Levantine Basin (northeastern Mediterranean). *Oceanologia*, 60(3), 288-304. DOI: 10.1016/j.oceano.2017.12.003
- Zabel, M., & Schulz, H. D. (Eds.). (2000). *Marine geochemistry*. Springer.
- Zark, M., Christoffers, J., & Dittmar, T. (2017). Molecular properties of deep-sea dissolved organic matter are predictable by the central limit theorem: Evidence from tandem FT-ICR-MS. *Marine Chemistry*, 191, 9-15. DOI: 10.1016/j.marchem.2017.02.005
- Zark, M., & Dittmar, T. (2018). Universal molecular structures in natural dissolved organic matter. *Nature communications*, 9(1), 3178. DOI: 10.1038/s41467-018-05665-9
- Zweifel, U. L., Norrman, B., & Hagstrom, A. (1993). Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Marine Ecology-Progress Series*, 101, 23-23.
- Zweifel, U. L., Wikner, J., Hagström, Å., Lundberg, E., & Norrman, B. (1995). Dynamics of dissolved organic carbon in a coastal ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 40(2), 299-305. DOI: 10.4319/lo.1995.40.2.0299
- Zhang, Y., Li, J., Dong, L., Li, Y., & Chen, X. (2008). Characterization of interaction between esculin and human serum albumin in membrane mimetic environments. *Journal of Molecular Structure*, 889(1–3), 119–128. DOI: 10.1016/j.molstruc.2008.01.040
- Zoccarato, L., Pallavicini, A., Cerino, F., Umani, S. F., & Celussi, M. (2016). Water mass dynamics shape Ross Sea protist communities in mesopelagic and bathypelagic layers. *Progress in Oceanography*, 149, 16-26. DOI: 10.1016/j.pocean.2016.10.003
- Zohary, T., Herut, B., Krom, M. D., Mantoura, R. F. C., Pitta, P., Psarra, S., ... & Woodward, E. M. S. (2005). P-limited bacteria but N and P co-limited phytoplankton in the Eastern Mediterranean—a microcosm experiment. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 52(22-23), 3011-3023. DOI: 10.1016/j.dsr2.2005.08.011
- Zubarev, R. A., & Makarov, A. (2013). Orbitrap mass spectrometry. DOI: 10.1021/ac4001223

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications parues

Martinot, P. L., Guigue, C., Chifflet, S., Cuny, P., Barani, A., Didry, M., **Dignan, C.**, Guyomarc'h, L., Pradel, N., Pringault, O., Van Wambeke, F., Tu Vu, C., Mari, X., Tedetti, M. (2023) Assessing the bioavailability of black carbon-derived dissolved organic matter for marine heterotrophic prokaryotes. *Science of The Total Environment*, 901, 165802. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165802

Publications en révision

Dignan, C., Lenoble, V., Pringault, O., Misson, B. (In review). An effect-based method to evaluate spatio-temporal variations of coastal marine DOM properties. *Journal of Marine Science and Engineering*.

Dignan, C., Lenoble, V., Garcia, N., Oursel, B., Cindrić, A. M., Misson, B. (In review). Hypervariable DOM properties in coastal NW Mediterranean Sea-Evidences of strong human influences and potential consequences for the heterotrophic base of planktonic food webs. *Estuarine-Coastal and Shelf Science*.

Publications en préparation

Dignan, C., Lenoble, V., Santinelli, C., Bachi, G., Dang, H., Garcia, N., Misson, B. Unraveling the major control of N-containing inorganic and organic molecules on DOM bioavailability in a Mediterranean coastal environment. *Limnology and Oceanography Journal*.

Dignan, C., Misson, B., Lenoble, V., Garcia, N., Oursel, B., Sanial, V. Influence of the sedimentary column on DOM properties and the functioning of the heterotrophic base of the planktonic food web.

Dignan, C., Chouba, C., Matthys, L., Domeau, A., Lenoble, V., Garcia, N., Dugeny, E., Souche, J. C., Montigny, C., Misson, B. Re-suspension of Mediterranean harbour sediments: a source of phosphates that stimulates the heterotrophic base of the planktonic marine food web.

Présentations orales et posters

Dignan, C., Lenoble, V., Pringault, O., Oursel, B., Misson, B. Assimilability of marine dissolved organic matter under the cross-influences of the life history of the microbial community and the properties of organic matter. AFEM, Oral communication, France (Novembre 2021).

Dignan, C., Lenoble, V., Pringault, O., Oursel, B., Misson, B. Marine dissolved organic matter biological lability under crossed influences of microbial community life history and organic matter properties. ASLO, Oral communication, France (Mai 2021)

Dignan, C., Lenoble, V., Santinelli, C., Bachi, G., Dang, H., Misson, B. Marine DOM biological lability under human pressure: changes in dissolved substances stimulate prokaryotic assimilation of DOM. ISME18, Poster, Lausanne, Suisse (Aout 2022)

Dignan, C., Lenoble, V., Santinelli, C., Bachi, G., Dang, H., Garcia, N., Misson, B. Unraveling the major control of N-containing inorganic and organic molecules on DOM bioavailability in a Mediterranean coastal environment. AFEM, Oral communication, Toulon, France (Octobre 2023)

Clara DIGNAN

Mediterranean Institute of Oceanography (M.I.O.), Université de Toulon

Biodisponibilité de la matière organique dissoute pour les procaryotes hétérotrophes en zone côtière
Méditerranéenne : caractérisation et hiérarchisation des facteurs de contrôle

La matière organique dissoute (DOM) et les procaryotes hétérotrophes (HP) sont reconnus comme des composants importants du cycle du carbone dans les océans. L'utilisation de la DOM par les HP est dépendante de sa biodisponibilité. La biodisponibilité est soumise à des variations naturelles et anthropiques qui sont d'autant plus conséquentes dans les zones côtières. Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques contrôlant la biodisponibilité sont connus mais la hiérarchie de leurs influences respectives est largement débattue. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse consistaient à étudier et comprendre les variations de biodisponibilité de la DOM dans un environnement côtier et le comportement de la communauté microbienne face à ces fluctuations. Caractériser, hiérarchiser et identifier les sources des facteurs modifiant la biodisponibilité de la DOM. D'après les résultats de cette étude, la biodisponibilité de la DOM est apparue déterminée principalement par des facteurs abiotiques. L'excès d'azote organique et de phosphore inorganique dans les zones côtières fortement anthropisées a stimulé la croissance bactérienne et modifié la structure de la communauté. L'étude de la composition moléculaire de la DOM a également permis de montrer que la présence et la consommation de molécules azotées (protéines, sucres aminés) et de glucides sont associées à une croissance des HP plus élevées. Ces facteurs abiotiques influent principalement sur le devenir du carbone à travers la boucle microbienne. Toutefois, la réactivité de la communauté microbienne face à un pool de DOM labile s'est avérée dépendante de la température. Enfin, la remise en suspension des sédiments est apparue comme une source potentielle de ces facteurs contrôlant la biodisponibilité de la DOM.

Mots clés : écosystèmes côtiers, Mer Méditerranée, matière organique dissoute, biodisponibilité, procaryotes hétérotrophes.

Bioavailability of dissolved organic matter for heterotrophic prokaryotes in the Mediterranean coastal zone: characterization and prioritization of control factors

Dissolved organic matter (DOM) and heterotrophic prokaryotes (HP) are recognized as important components of the carbon cycle in the oceans. The use of DOM by HP is dependent on its bioavailability. Bioavailability is subject to natural and anthropogenic variations which are all the more significant in coastal areas. Several biotic and abiotic factors controlling bioavailability are known but the hierarchy of their respective influences is widely debated. In this context, the objectives of this thesis were to study and understand the variations of DOM bioavailability in a coastal environment and the behavior of the microbial community in the face of these fluctuations. Characterize, prioritize and identify the sources of factors modifying the DOM bioavailability. According to the results of this study, the DOM bioavailability appeared to be determined mainly by abiotic factors. Excess organic nitrogen and inorganic phosphorus in highly anthropized coastal areas stimulate bacterial growth and alter community structure. The study of the molecular composition of DOM has also shown that the presence and consumption of nitrogenous molecules (proteins, amino sugars) and carbohydrates is associated with higher HP growth. These abiotic factors mainly influence the fate of carbon through the microbial loop. However, the reactivity of the microbial community against a pool of labile DOM was found to be temperature dependent. Finally, the resuspension of sediments appeared as a potential source of these factors controlling the DOM bioavailability.

Keywords: Coastal ecosystem, Mediterranean Sea, dissolved organic matter, bioavailability, heterotrophic prokaryotes.