

L'Institut Agro Rennes-Angers

☐ Site d'Angers ☒ Site de Rennes

Année universitaire : 2024-2025

Spécialité :

Ingénieur en agronomie

Spécialisation (et option éventuelle) :

Sciences halieutiques et aquacoles, préparée à l'Institut
Agro Rennes-Angers (Aquaculture)

Mémoire de fin d'études

- ☐ d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
- ☐ de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)
- ☐ de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2)
- ☒ d'ingénieur d'UniLaSalle Rouen

Étude de l'alcalinisation de l'eau de mer et de son impact sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse

Par : Luna DUCOULOMBIER

Soutenu à Rennes le 10/09/2024

Devant le jury composé de :

Président et enseignant référent : Pablo BROSSET

Maître de stage : Fabrice PERNET

Autres membres du jury : Bastien SADOUL (Enseignant-chercheur Institut Agro Rennes-Angers), et Stéphanie AUZOUX-BORDENAVE

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de
Modification 4.0 France» disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

☒ Non ☐ Oui si oui : ☐ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date de fin de confidentialité (2) : 

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur ⁽³⁾ Nom Prénom Ducanlonkin Luna

autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☒ Oui ☐ Non

Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☒ la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) ☒ accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-BY-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

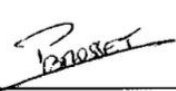
Date et signature de l'auteur : 10/09/24 

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☒ Oui ☐ Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Date de fin de confidentialité (2) : 10/09/2024 

Utilisation de l'Intelligence Artificielle (IA) pour la rédaction du mémoire

L'intelligence artificielle a été utilisée pour améliorer le texte ☐ Oui ☒ Non

Si oui, préciser pour quelle partie de texte et à quelles fins ?

Toute absence de déclaration précise sera considérée comme un manquement aux règles de l'éthique scientifique.

Date de fin de confidentialité (2) : 

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation de l'Institut Agro Rennes-Angers s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude envers IFREMER, pour cette belle opportunité dans le monde de la mer que je chéris tant. Merci de continuer à œuvrer pour la protection et l'utilisation durable des océans, je suis fière de compter un tel institut au sein de mon pays et d'avoir pu participer à ses actions dans le cadre de mon stage.

Je tiens à remercier mes encadrants de stage, Fabrice, Carole et Hugo qui m'ont accompagnée durant ces 6 mois de stage et qui m'ont fait découvrir le fabuleux monde de la recherche. Un grand merci pour votre pédagogie, vos conseils et votre bonne humeur. Merci aussi pour toutes ces discussions sur mon orientation professionnelle, je penserai à vous en choisissant mon futur emploi !

Un énorme merci à la station d'Argenton et à toute l'équipe qui la fait vivre ! On ne peut pas rêver mieux comme cadre pour un stage de fin d'études. Merci Jacqueline de m'avoir accompagnée dans mes premiers gestes techniques en larvaire, merci à Moussa pour cette journée riche en phyto et ta disponibilité, merci à Mathias de m'avoir épaulée dans les montages de mes systèmes expérimentaux. Merci aussi à Thomas et à ta belle énergie, tu m'as aidée à moins me sentir perdue quand j'en avais besoin !

Je tiens à remercier également Andréaz, qui m'a impressionnée en statistiques et qui m'a aidée à voir mes données d'une nouvelle façon. Merci aussi à Stéphane pour ton humour et de m'avoir permis de faire une escapade en bateau ! Vive Dune.

Évidemment, un grand merci à Quentin, mon coloc de bureau et à Mélody, qui a su faire de nous plus que des collègues ! Je suis très heureuse de vous compter parmi mes amis et votre soutien m'a été d'une grande aide durant ces dernières semaines de stages. Vos bavardages... un peu moins... On se reverra mais je vous souhaite une super continuation, Quentin tu te trouveras la plus belle thèse au monde et Mélody tu réussiras la tienne avec brio j'en suis sûre !

Abel, merci de nous avoir emmener chasser les étrilles et pour la superbe soirée tahitienne, je te souhaite plein de Vieilles et beaucoup de bonheur dans ta thèse avec Stéphane.

Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement l'Institut Agro qui m'a acceptée dans ses rangs en février 2023 en tant que nouvelle étudiante, sans cette mobilité halieutique je ne suis pas sûre que j'en serai là aujourd'hui. Merci de m'avoir permis de me rapprocher de mes rêves professionnels aquatiques !

Table des matières

Remerciements

Liste des illustrations

Liste des tableaux

<i>Introduction</i>	1
<i>Matériel et méthodes</i>	4
Animaux et maintenance	4
Minéraux	4
Plans expérimentaux	5
Observation du développement larvaire	8
Mesures de la chimie des carbonates et des composés chimiques de l'eau	9
Analyse statistique	9
<i>Résultats</i>	11
Résultats des expérimentations d'alcalinisation de l'eau de mer	11
Mesure des normes de réaction de l'huître creuse vis-à-vis de l'alcalinité (Exp. 1-6)	13
Mesure de l'effet familial sur la résistance de l'huître creuse vis-à-vis de l'alcalinité (exp. 7)	18
Mesure de l'effet d'une exposition précoce à alcalinité élevée sur le développement larvaire ultérieur (exp. 1BIS)	19
<i>Discussion</i>	21
Mise en place des protocoles d'alcalinisation de l'eau de mer	21
Les impacts de l'alcalinité sur les larves d'huître creuse	22
Limites de l'étude et voies d'amélioration	24
<i>Conclusion</i>	26
<i>Bibliographie</i>	27
<i>Annexes</i>	29
Annexe 1 : Protocole détaillé	29
Annexe 2 : Consommation algale des larves Exp 1.BIS	36
Annexe 3 Tableau des tailles de larves d'huîtres selon les familles (Exp. 7)	37
Annexe 4 Résultats de l'élevage en petit volume	38
<i>Résumé</i>	39
<i>Abstract</i>	39

Liste des illustrations

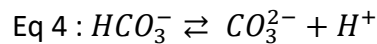
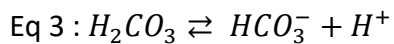
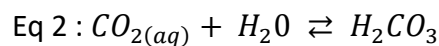
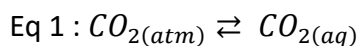
Figure 1 Graphique de Bjerrum illustrant l'équilibre du DIC en fonction du pH, obtenu via la fonction bjerrum du package « seacarb » (gattuso, 2024).	1
Figure 2 Exemples de larves D normales ou en retard de croissance	8
Figure 3 Exemples d'anormalités observées sur les larves D	8
Figure 4 Effets du pH (en haut) et du ratio minéral/eau de mer (en bas) sur la dissolution de la poudre d'huître. Les expérimentations sont réalisées en pilulier de 45ml, sans agitation (Exp.0).	12
Figure 5 Relations des taux de normalité et longueurs des coquilles par rapport aux différentes expositions alcalines. Chaque point représente respectivement un taux sur n=100 individus et une longueur de coquille moyenne sur n=50 individus. Les lots sont décrits dans le tableau 1 et 2(Exp.1-6)..	14
Figure 6 Évolution des concentrations de différents ETM en fonction de l'alcalinité (TA) et du lot pour le témoin et les différents types de minéraux : calcaire, Na ₂ CO ₃ , olivine, poudre de coquille d'huître.	17
Figure 7 Relations des taux de normalité des larves D par rapport aux différents niveaux d'expositions et de source d'alcalinité. Chaque point représente la moyenne des taux calculés sur les 10 familles pour chaque minéral. Les lettres indiquent les différences significatives (Pvalue < 0,05)(Exp. 7).....	18
Figure 8 Évolution de la longueur des coquilles de larves d'huîtres durant les 14 jours d'élevage larvaire selon le traitement alcalin ou non durant les 48h premières heures de transformation. Chaque point représente la moyenne des tailles mesurées sur 50 individus dans 3 flûtes par condition. Les lettres indiquent les différences significatives entre les deux groupes expérimentaux (Pvalue <0,05) (Exp. 1BIS)	19
Figure 9 Taux calculés durant le développement larvaire de l'huître creuse durant l'exp. 1BIS	20

Liste des tableaux

Tableau 1 : Descriptions des reproductions d'huîtres creuses et des 7 lots obtenus pour les expérimentations (le lot n°2 était non viable et n'a pas été utilisé).....	4
Tableau 2 Résumé des conditions de fabrication des eaux alcalines pour chaque lot expérimental.....	6
Tableau 3 Essais de dissolution avec trois différents minéraux dans des piluliers de 45 ml à pH 5 (Exp.0).	11
Tableau 4 Paramètres d'alcalinisation d'eau de mer pour 600ml de solution alcaline (AT finale = 11 000 à 15 000 µmol/L) (Exp.0).	11
Tableau 5 Résultats statistiques d'ajustements de modèles linéaires sur le taux de normalité et la taille des larves en fonction de l'exposition et la source à l'alcalinité. Les résultats en orange mettent en avant les corrélations significatives (Pvalue <0,05)(Exp.1-6).	15
Tableau 6 Longueurs moyennes des larves d'huîtres par condition et écart entre les conditions selon le jour (Exp. 1BIS)	20

Introduction

L'acidification des océans évolue comme jamais observé auparavant, impacte une multitude d'organismes vivants et perturbe l'équilibre chimique de l'eau. Ce phénomène, comme le réchauffement climatique, est l'une des conséquences de l'augmentation du carbone atmosphérique qui est produit notamment par la combustion d'énergies fossiles. Depuis la révolution industrielle (fin du XVIII^e siècle), on estime à 40% l'augmentation de dioxyde de carbone (CO_2) dans l'atmosphère (NOAA Research, 2024), événement sans commune mesure à l'échelle géologique (Zeebe, 2012). Via l'activité humaine, le carbone initialement stocké sur terre grâce à des processus naturels très longs se retrouve ainsi libéré dans l'atmosphère de manière effrénée, et s'accumule dans l'atmosphère ou bien est absorbé par les puits de carbone naturels tels que les océans. Environ 25% du CO_2 se dissout ainsi dans les océans, limitant donc l'augmentation de l'impact des gaz à effets de serre (GES) sur le réchauffement climatique. Cette dissolution engendre une suite de réactions chimiques (voir équations ci-dessous) qui conduisent à une libération d'ions H^+ responsables de la baisse du pH ou de l'augmentation de l'acidité, selon la relation $pH = \log[H^+]$. Le pH aurait ainsi diminué de 0,1 unité pH depuis la révolution industrielle équivalent à +30% d'acidification (Gattuso & Hansson, 2011).



De plus, l'équilibre du carbone inorganique dissous (DIC), soit la répartition entre les ions bicarbonates (HCO_3^-), les ions carbonates (CO_3^{2-}), et le CO_2 (molécules plus ou moins présentes selon l'équilibre des équations ci-dessus) est dépendant du pH, mais aussi de la température et de la salinité (Wolf-Gladrow et al., 2007). Au pH moyen actuel des océans (8,1), les ions bicarbonates sont en concentration majoritaire (91%) et sont suivis par les ions carbonates et le CO_2 (voir figure 1). Selon les scénarios du 6^{ème} rapport établi par le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), le pH pourrait diminuer de 0,16 à 0,44 unités pH à l'horizon 2100. Le point d'équilibre de la spéciation du DIC serait donc décalé et la part d'ions bicarbonates et de CO_2 augmenterait au détriment de la part des ions carbonates (Calvin et al., 2023).

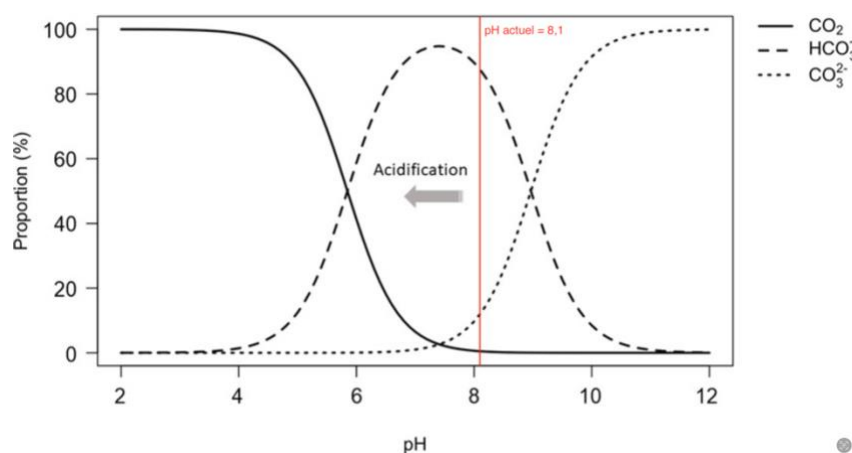
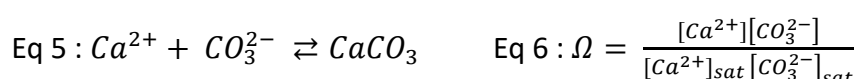


Figure 1 Graphique de Bjerrum illustrant l'équilibre du DIC en fonction du pH, obtenu via la fonction *bjerrum* du package « *seacarb* » (gattuso, 2024).

L'acidification des océans déséquilibre donc le système des carbonates et perturbe par conséquent le phénomène de bio minéralisation. Ce processus permet aux organismes calcifiants de former leur coquille ou leur squelette constitués principalement de carbonate de calcium (CaCO_3) (voir équation 5). Dans le cas de l'huître creuse, des ions Ca^{2+} et CO_3^{2-} sont accumulées dans l'espace extra-palléal où ils précipitent pour former le CaCO_3 et donc la coquille. La disponibilité en ions carbonates (qui pour rappel diminue avec l'acidification) est donc déterminante, mais la calcification dépend aussi du taux de saturation (désigné par la lettre oméga, Ω), qui lorsqu'il est supérieur à 1 permet la précipitation du calcaire et lorsqu'il est inférieur à 1 favorise sa dissolution (voir équation 6). En induisant une baisse des ions carbonates, l'acidification vient donc également diminuer ce taux de saturation et empêche la calcification si celui-ci devient inférieur à 1 (Zeebe, 2012).



Plus de 10 000 articles scientifiques ont documenté l'impact de l'acidification des océans et de l'altération subséquente de la chimie des carbonates sur les organismes marins (Dupont & Metian, 2023). L'acidification met en difficulté les organismes calcifiants qui sont impactés par la diminution des ions carbonates et la baisse du taux de saturation pour effectuer leur bio minéralisation. Elle perturbe également l'homéostasie, la respiration, le métabolisme énergétique de la plupart des animaux marins (Leung et al., 2022).

Dans ce contexte de dérèglement océanique, la conchyliculture, filière qui représente 70% des ventes aquacoles françaises (en valeur, pour 2020) (Agreste, 2022), ne sera pas épargnée et doit faire face à ces perturbations. Cependant, même si beaucoup de recherches ont été menées sur l'étude de ces impacts, peu se sont concentrées sur l'atténuation de l'acidification en elle-même. Une nouvelle voie semble toutefois émerger : le renforcement de l'alcalinité des océans (ocean alkalinity enhancement en anglais, OAE) (Oschlies *et al.*, 2023). L'alcalinité, décrite comme étant la mesure de la capacité d'une solution à résister au pH, est désignée par A_T pour « alcalinité totale » et s'obtient via l'équation 7 ci-dessous (Zeebe, 2012). Le principe de l'OAE consiste donc à augmenter la concentration des molécules receveuses de protons H^+ libres, responsables de la baisse du pH, afin de diminuer leur concentration. Cela a pour effet de remonter le pH et de diminuer la pression partielle de CO_2 ($p\text{CO}_2$) : le CO_2 se transforme plus rapidement en bicarbonates et carbonates car le milieu n'est plus saturé en ions H^+ (voir équations 1, 2, 3 et 4).

$$\text{Eq 7 : } A_T = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{B(OH)}_4^-] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+] + \text{composés mineurs}$$

L'OAE est étudiée autour de deux objectifs : le premier est d'augmenter le potentiel de puits de carbone de l'océan via la diminution de $p\text{CO}_2$ et le second objectif est de lutter contre l'acidification qui met en difficulté les organismes et modifie la chimie des carbonates sur laquelle se base la bio-minéralisation des organismes calcifiants. De nombreuses méthodes sont en développement pour mettre en place l'OAE : l'accélération de l'érosion du calcaire, le chaulage des océans, l'apport de minéraux en zone côtière, la création de carbonates hydratés ou encore l'élimination électrochimique de l'acidité (Eisaman et al., 2023). Cependant, quelle que soit la méthode utilisée, les lieux où elle serait mise en place atteindraient des valeurs bien plus élevées que dans le milieu naturel, une étude d'impact est donc nécessaire avant la mise en place de tels projets (Dupont et Metian, 2023).

La présente étude s'inscrit dans le projet MITIC (Mitigation des effets du changement climatique sur les coquillages, financement FEAMPA national 2024-2027) dont l'objectif général est d'évaluer le potentiel d'adaptation des coquillages cultivés en France vis-à-vis du changement climatique et de proposer des protocoles de mitigation de ces effets. Ce sujet expérimente des protocoles d'alcalinisation renforcée des océans et tente de mesurer l'éventuelle toxicité de différents niveaux d'alcalinités sur l'huître creuse *Crassostrea Gigas*. Le modèle d'étude choisi est une espèce à haute valorisation aquacole qui représente 70% des ventes en valeur en 2019 de la filière conchylicole soit 398 M€ (Agreste, 2021). Les expérimentations ont été réalisées sur les stades de vie les plus sensibles, les stades embryolairvaires (les premières 48 h post-fécondation) dans le but d'observer leur survie et de surveiller différents indicateurs de développement : présence de malformation, croissance en taille, alimentation. Pour réaliser cette étude, il a avant tout été nécessaire d'établir un protocole de fabrication d'eau alcaline. Dans le milieu naturel, l'alcalinité augmente via l'érosion, et plus précisément via la dissolution d'éléments carbonatés ou de minéraux tels que l'olivine ou le basalte (Oschlies *et al.*, 2023). Il a été choisi dans cette étude de travailler principalement sur la dissolution d'un co-produit abondant et peu coûteux de la conchyliculture : les coquilles d'huîtres, matériel riche en aragonite et en calcite, deux polymorphes du carbonate de calcium. A but de comparaison, d'autres matériaux ont été testés tels que l'olivine, le calcaire et le carbonate de sodium.

Matériel et méthodes

Animaux et maintenance

Les larves d'huîtres creuses ont été produites à différentes échéances (voir tableau) selon le protocole décrit dans Petton et al., (2013). Les géniteurs sont récupérés dans le milieu naturel puis sont conditionnés à la station Ifremer d'Argenton pendant un minimum de 5 semaines dans des bassins de 400L (à 17°C) à flux ouvert (voir tableau pour l'origine et le temps de conditionnement). Les huîtres sont nourries via un mélange de microalgues (*Chaetoceros sp.* et *T-Isochrysis lutea.*) à un ratio volumétrique de 1:1 produit à la station. Les gamètes sont prélevés par scarification suivant le type de fécondation, massale ou biparentale (voir tableau) et mélangés dans un bécher de 5L à raison de 50 spermatozoïdes par ovocyte. Trois heures après la mise en contact des gamètes, un taux de fécondation est déterminé et les embryons sont prêts à êtreensemencés dans leur milieu d'expérimentation.

Tableau 1 : Descriptions des reproductions d'huîtres creuses et des 7 lots obtenus pour les expérimentations (le lot n°2 était non viable et n'a pas été utilisé)

N° de lot	Date de la reproduction	Temps de conditionnement géniteurs	Origine des géniteurs	Ratio mâles/femelles	Type de fécondation
1	13/03/24	5 semaines	Ile d'Aix	5 ♂ 24 ♀	Pool
2	10/04/24	57 jours	Aber Benoît	4 ♂ 4 ♀	Pool
3	24/04/24	71 jours	Aber Benoît	4 ♂ 4 ♀	Pool
4	28/05/24	105 jours	Aber Benoît	3 ♂ 3 ♀	Pool
5	04/06/24	6 semaines	Parc BR08	6 ♂ 6 ♀	Pool
6	18/06/24	126 jours	Aber Benoît	3 ♂ 3 ♀	Pool
7	09/07/24	5 semaines	NA	10 ♂ 10 ♀	Biparental

Minéraux

Les minéraux utilisés étaient tous sous forme de poudre, ce qui permet de maximiser la surface d'échange avec l'eau de mer pour favoriser leur dissolution et donc l'alcalinisation de l'eau. Les quatre minéraux qui ont été utilisés pour les tests d'alcalinisation et d'exposition larvaire ont tous été cités comme source potentielle d'alcalinité dans le guide des bonnes pratiques sur la recherche sur l'OAE (Oschlies et al, 2023).

Micro-brisure de coquilles d'huîtres : poudre de coquille d'huître utilisée à la station d'Argenton comme support de fixation pour le naissain, granulométrie comprise entre 200 et 300 µm. Réf. : (Ovive : microbrisures lavées traitées [TL03] 200-300 µm / KG)

Olivine : (Fe, Mg)₂ SiO₄. Réf. : (Sibelco, Norvège, 1400-63 µm)

Calcaire : CaCO₃, MgCO₃. Réf. : (Forschungsgemeinschaft Kalk & Mörtel e.V., <100 µm)

Carbonate de Sodium : Na₂CO₃. Réf. : (TATA E.U., Sodium Carbonate, Anhydrous)

Plans expérimentaux

1. Expérimentations préliminaires d'alcalinisation de l'eau de mer (exp. 0)

L'alcalinisation de l'eau de mer consiste à dissoudre des minéraux carbonatés ou silicatés dans l'eau de mer afin d'en augmenter son alcalinité (voir Eq. 7). Cependant, l'eau de mer étant sursaturée vis-à-vis des carbonates, il faut au préalable baisser le pH pour favoriser la dissolution et ainsi l'alcalinisation.

Pour alcaliniser au mieux l'eau de mer, plusieurs minéraux et paramètres ont été étudiés. Quatre minéraux différents ont été testés, en premier lieu la micro-brisure de coquilles d'huîtres sur laquelle la majorité des tests ont été réalisés, puis sur la base de ces résultats des essais plus succincts ont été faits sur l'olivine, le calcaire et le carbonate de sodium. Les paramètres testés étaient le pH de l'eau de mer, le ratio eau/minéral, la durée de contact eau/minéral, la stabilité dans le temps, la dissolution en milieu fermé ou non.

Par exemple, pour la poudre de coquilles d'huîtres, la dissolution a été testée avec quatre pH initiaux différents (pH 5, pH 6, pH 7 et pH 8), avec dix temps de contact eau de mer/poudre différents (de 1 minute à 5 heures) et trois ratios eau de mer/poudre différents.

L'eau de mer était prélevée dans la station d'Argenton et son pH était ajusté par un bullage de CO₂ et contrôlé via un instrument de mesure multi-paramètres (MultiLine® Multi 3630 IDS - WTW: pH electrode SenTix® 940, oxygen sensor FDO® 925, conductivity electrode TetraCon® 925; Xylem Analytics, Weilheim in Oberbayern, Germany). Des piluliers de 45 ml étaient ensuite remplis d'eau de mer, la poudre de minéral était pesée sur une balance de précision (g) (Ohaus, navigator NVT2201) avant d'être rajoutée, puis les couvercles des piluliers étaient fermés ou non. Après la durée de contact définie écoulée, l'alcalinité totale des échantillons était déterminée en suivant les recommandations du « *Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurements* » (*standard operating procedures : Determination of total alkalinity in sea water*) (Dickson et al., 2007). Les échantillons étaient filtrés sur des filtres de seringue à 0.2µm (Milipore, Millex® 0.22 µm, diam. 25 mm) afin de retirer les particules (non dissoutes) puis l'alcalinité était mesurée par titration à l'acide chlorhydrique (c(HCl) = 1 mol/l (1 N), Titripur®, reag. Ph. Eur., reag. USP | Sigma-Aldrich) à l'aide du titreux d'alcalinité (888 Titrando, Metrohm). Dans l'objectif de produire de plus gros volumes d'eau alcaline, la même procédure a été mise en œuvre dans des bēchers de 2L ou des ballons de 5L où il était possible d'ajouter une agitation magnétique et/ou un bullage de CO₂.

Grâce à ces expérimentations, il a été possible de concevoir des protocoles de préparation d'eau alcaline nécessaires aux expositions larvaires. Les protocoles pour chaque minéral ne diffèrent que sur la durée de dissolution et la quantité de poudre à ajouter (voir tableau). De l'eau de mer était prélevée, filtrée sur un filtre à cartouche de 1µm et un filtre UV et acidifiée à pH 5 via un bullage de CO₂. La poudre de minéral était ajoutée et pour accélérer le processus de dissolution un brassage électromagnétique pouvait être mis en place, et/ou le bullage de CO₂ pouvait être conservé pour maintenir le milieu à pH 5 (voir tableau résultat). Une fois le temps de contact écoulé la solution était filtrée sur des filtres en microfibre de verre GF/F de 0.2µm ou 0.35µm ou 0.7µm selon la disponibilité. Enfin la solution était remontée à pH 8 via un bullage d'air ambiant et l'alcalinité mesurée par titration. Les protocoles sont conçus pour produire une solution mère à très forte alcalinité ($A_t > 11\,000\ \mu\text{mol/L}$) qui est ensuite diluée pour obtenir les conditions expérimentales choisies. Le diluant

est de l'eau de mer ayant subi les mêmes étapes que la solution mère, excepté l'ajout de minéral alcalin : il est filtré, acidifié à pH 5 par bullage de CO₂ et basifié par bullage d'air jusqu'à atteindre le pH initial (pH ≈ 8). Les paramètres des solutions filles (pH, salinité, température et oxygène dissous) étaient vérifiés à l'aide de la sonde multi-paramètres avant l'introduction des embryons d'huître creuse.

2. Mesure des normes de réaction de l'huître creuse vis-à-vis de l'A_T (exp. 1-6)

Les bio-essais reposent sur la norme Afnor XP T90-382, « Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de bivalve » (2009). Ils ont été effectués dans des piluliers en plastique d'environ 45 ml préalablement désinfectés à l'eau de javel à 25% (200ml/10L d'eau), rincés à l'eau chaude, puis mis à tremper dans de l'eau de mer jusqu'à utilisation. Les piluliers sont ensuite remplis par les solutions d'eau de mer aux différents niveaux d'alcalinité préparées à l'aide du protocole d'alcalinisation. Des gammes de 10 niveaux d'alcalinité allant de 2300 à 11 000 µmol/kg étaient préparées, le tout pour chaque minéral testé (voir tableau). Les piluliers étaient ensuite disposés aléatoirement dans une pièce chauffée à 22°C avant l'ajout des embryons. Les embryons étaient préparés selon le protocole de reproduction décrit plus haut et ajoutés à chaque pilulier à une concentration finale de 2700/45=60 embryons par ml. Après incubation de 48h dans les piluliers fermés (sans bullage ni agitation) les embryons devenus larves D étaient récupérés sur un tamis de 20 µm et conservés dans des tubes eppendorf avec une goutte de formol à 4% avant observation du développement. L'eau des piluliers était récupérée pour une éventuelle vérification de l'alcalinité. Pour plus de détails, le protocole rédigé pour la manipulation 1 est accessible en annexe 1.

Tableau 2 Résumé des conditions de fabrication des eaux alcalines pour chaque lot expérimental

Lot	Date	Minéraux utilisés	Nombre de série par minéral	Taille filtre des solutions
1	13/03/24	Poudre de coquille d'huître	2	0.2µm
2	10/04/24	Poudre de coquille d'huître	2	0.2µm
3	24/04/24	Poudre de coquille d'huître	3	2 séries 0.2µm 1 série 1µm
4	28/05/24	Poudre de coquille d'huître, calcaire, olivine, carbonate de sodium	1	0.35µm
5	04/06/24	Poudre de coquille d'huître, calcaire, olivine, carbonate de sodium	1	0.35µm
6	18/06/24	Poudre de coquille d'huître, calcaire, olivine, carbonate de sodium	1	0.35µm
7	09/07/24	Poudre de coquille d'huître, olivine	1	0.7µm

3. Mesure de l'effet familial sur la résistance de l'huître creuse vis-à-vis de l' A_T (exp. 7)

L'objectif de cette expérimentation en bio-essais était de compléter les données obtenues durant les exp 1-6 en se concentrant sur les minéraux ayant eu un impact sur l'huître creuse. Le protocole utilisé est très similaire mais présente quelques modifications listées ci-après. Pour obtenir des réplicats biologiques, des reproductions biparentales ont été réalisées et dix familles ont été ainsi constituées. La gamme d'alcalinité a également été modifiée pour être réduite à quatre niveaux : de l'eau ambiante pour les témoins, et 3 niveaux à 4000, 6000 et 9000 $\mu\text{mol/L}$ d'alcalinité, avec une gamme par minéral. Les niveaux ont été choisis en fonction des points de bascules observés lors des exp 1-6.

4. Effet d'une exposition précoce à alcalinité élevée sur le développement larvaire ultérieur (exp. 1BIS)

Les conditions témoins (eau de mer filtrée) et alcalines ($A_t \approx 11\,000\ \mu\text{mol/kg}$) étaient préparées en triplicats dans des bécards d'1L et les embryons étaient ajoutés à raison de 200/ml soit 200 000 larves par bécard. Les bécards étaient laissés en incubation 48h à 22°C sans bullage ni agitation puis un taux de larves D était déterminé avant le transfert dans le système d'élevage larvaire. A partir de cette étape le système d'élevage était identique au protocole de production du naissain standardisé d'Ifremer (NSI), l'eau alcalinisée n'était plus utilisée. L'élevage était réalisé en flûtes de 5L en circuit ouvert avec un taux de renouvellement de 50ml/min et une température de la salle maintenue à 25°C. L'eau de sortie des flûtes est filtrée via une crépine dont le diamètre de la maille doit être minimum deux fois inférieur au diamètre moyen des larves. Les changements de crépine interviennent donc régulièrement, généralement à J+8 et J+13 après fécondation. Les larves sont alimentées *ad libitum* comme les géniteurs et l'ingestion est suivie grâce à un compteur de particules électronique (Coulter Multisizer 3) qui donne une concentration en volume d'algues par microlitre ($\mu\text{m}^3/\mu\text{l}$). A J+14 après fécondation un taux de larve œillée est déterminé pour chaque flûte, et dès qu'il est environ égal à 90% (environ 2 semaines après fécondation) les larves sont transférées en salle de fixation. Les larves sont réparties sur des tamis de dimensions 44*14.5*9.5 cm avec un maillage de 125 μm et de la micro-brisure d'huître est rajoutée comme substrat de fixation. La micro-brisure est tamisée environ deux semaines plus tard et un taux de fixation est calculé pour chaque tamis. L'expérimentation est arrêtée à ce stade. Des mesures de tailles sont réalisés sur une cinquantaine d'individus par flûte à J2, J6, J9, J14 et J26, et des taux de survie/de transformation sont calculés (survie en phase pélagique, survie totale, taux de fixation, taux de larve œillée, taux de fixation) sur la base des estimations régulières de concentration de larve (via un comptage dans un volume connu, minimum 100 individus).

Observation du développement larvaire

Les larves ont été observées à l'aide d'un microscope numérique (Keyence® VHX-5000; Keyence Corporation, Osaka, Japan). Pour chaque échantillon, un taux de normalité était réalisé sur 100 individus via le calcul suivant (voir figure 2 et 3 pour les différentes catégories):

Taux anormalité = $100 - \text{nombre de larves en retard de développement} - \text{nombre de larves avec un défaut de croissance}$

Une longueur de coquille moyenne était également calculée à partir de 50 larves avec pour mesure de référence le plus long axe perpendiculaire à la charnière. L'apparence globale des larves était également appréciée via une galerie photo permettant de comparer les différentes conditions.

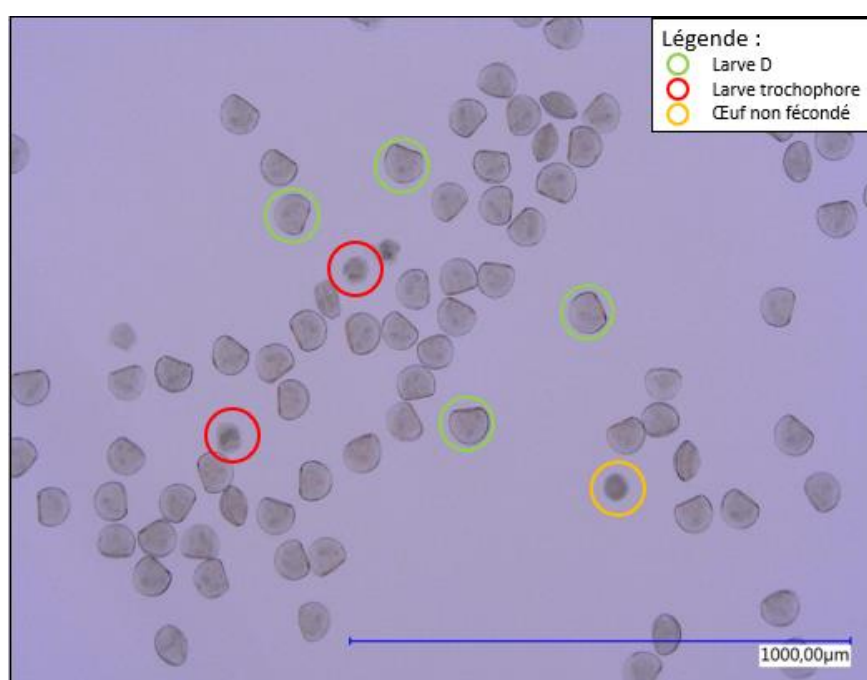


Figure 2 Exemples de larves D normales ou en retard de croissance

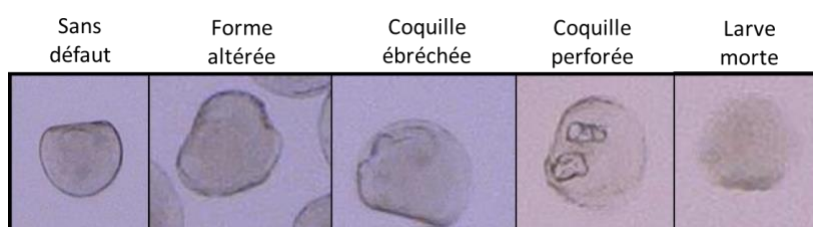


Figure 3 Exemples d'anormalités observées sur les larves D

Mesures de la chimie des carbonates et des composés chimiques de l'eau

La salinité, la saturation en oxygène, la température et le pH total de l'eau de mer étaient mesurés à l'aide d'une sonde multi-paramètres. Ces paramètres étaient relevés pour chacune des solutions servant à la préparation des conditions des différentes expérimentations mais aussi lors des élevages larvaires où les paramètres étaient mesurés quotidiennement pour chaque réplicat dans un but de surveillance.

Comme décrit plus haut, l'alcalinité totale était dosée à l'aide d'un titreur d'alcalinité soit lors de la conception des différents niveaux d'alcalinité requis par les expériences soit après expérimentation pour déterminer les variations d'alcalinité après une exposition larvaire. Le titreur était calibré une fois par semaine à l'aide de tampons Certipur NBS et via un tampon TRIS.

Ces mesures d'alcalinité ont été complétées à l'aide du package *Seacarb* et de la fonction *carb* par les autres paramètres de la chimie des carbonates calculés à partir des valeurs obtenues par le titreur : température, alcalinité, salinité. Pour chaque échantillon d'eau dosé avec le titreur d'alcalinité il était ainsi possible d'obtenir le CID, la $p\text{CO}_2$, l'oméga aragonite, l'oméga calcite etc.

Des échantillons des conditions $A_t = 3000$, $A_t = 6000$ et $A_t = 11000$ des lots 4, 5 et 6 ont été envoyés à l'université d'Utrecht (Pays-Bas) pour analyse des éléments trace métalliques (ETM).

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *Rstudio*, *R* v.4.4.0. pour les ANOVA et les régressions linéaires et non linéaires et le logiciel SAS a été utilisé en parallèle pour les ANOVA à mesure répétées.

Les résultats issus de la dissolution de minéraux (exp. 0) ont été analysés via des régressions linéaires (fonction *lm()*, et *cor.test()* pour vérifier la significativité des corrélations). Pour examiner la relation entre la durée de dissolution et la concentration de la substance dissoute (AT), un modèle de régression log-linéaire a été ajusté. La variable dépendante, AT, a été transformée en son logarithme naturel ($\log(AT)$), et une régression linéaire a été effectuée en utilisant $\log(\text{durée})$ comme variable indépendante. Les résultats sont présentés sous forme de graphique via la fonction *ggplot()* du package *ggplot2*. Les régressions et leurs intervalles de confiances sont représentés via le paramètre *geom_smooth()* de cette même fonction.

Les mesures de longueur de coquilles et les taux de normalités des expériences 1 à 6 ont également été analysés via des régressions linéaires. Avant analyse, les mesures de longueurs de larve ont été moyennées par unité expérimentale (ici par pilulier) car les individus au sein des piluliers ont été considérés comme des pseudo-réplicats.

Pour l'expérimentation 1-BIS, qui a testé l'effet de l'exposition précoce des larves à l'alcalinité et l'impact sur leur croissance, plusieurs résultats ont été analysés. Un modèle d'analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs à mesures répétées a été utilisé pour étudier la relation entre la croissance et l'exposition à l'alcalinité en fonction du temps. Les mesures de

larves sont ici à nouveau regroupées pour former trois réplicats par condition, ces réplicats étant considérés comme des mêmes individus mesurés à plusieurs reprises tout au long de l'expérimentation. Étant donné que les mesures ne sont pas indépendantes au cours du temps, un modèle autorégressif a été utilisé pour capturer la corrélation entre les valeurs de croissance mesurées à différents moments. Ce modèle a été implémenté dans SAS en tant que structure de corrélation pour prendre en compte la dépendance temporelle des données. Un test deux à deux de type pairwise est utilisé pour faire des comparaisons multiples entre les niveaux de facteur. Les différents taux calculés au cours de la croissance sont eux comparés via une ANOVA à un facteur (1 taux par flûte soit $n=6$).

Les résultats de l'expérimentation 7, qui présentent l'effet familial en plus de l'effet de l'alcalinité sur les larves d'huîtres, ont été analysés à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs pour évaluer l'effet de l'alcalinité et du type de minéral sur la normalité des larves, avec interaction. Avant analyse, les familles ont été regroupées pour observer l'effet global de l'alcalinité. Un test pairwise a été à nouveau fait, et les erreurs standards sont représentées via la fonction ggplot.

Résultats

Résultats des expérimentations d'alcalinisation de l'eau de mer

Les résultats mis en avant sur les graphiques page suivante ont été obtenus durant les essais de dissolution sur la poudre de coquilles d'huîtres, les résultats des autres minéraux étant moins complets ils ne seront que résumés dans le tableau 3. La figure 4 (haut) présente deux cinétiques de dissolution, l'une avec une eau de mer acidifiée à pH 5 et l'autre à pH 6. On observe que les dissolutions sont très rapides durant la première demi-heure avant de ralentir pour se stabiliser à partir de 60 minutes. La dissolution est un petit peu plus rapide à pH 5, elle atteint une A_T d'environ 5 000 $\mu\text{mol/L}$ quasiment instantanément et monte jusqu'à 9 000 $\mu\text{mol/L}$ en 4h contre 5 000 $\mu\text{mol/L}$ à pH 6. Les modèles linéaires utilisés sur les données log-transformées montrent des corrélations positives significatives entre le temps et l'alcalinité. La figure 4 (bas) montre une relation linéaire entre la quantité de poudre de coquilles d'huîtres dans 45ml d'eau et l'alcalinité obtenue : 1 gramme de poudre de coquille d'huître ajouté entraîne une hausse d'alcalinité d'environ 1283 $\mu\text{mol/L}$. Durant les expérimentations, il a également été observé que l'alcalinité était très stable dans le temps en milieu ouvert ou fermé : aucune précipitation n'a été retrouvée et les mesures d'alcalinité n'évoluent pas ou du moins pas de manière détectable.

Les essais complémentaires sur les autres minéraux (voir tableau 3) ont montré que les poudres de Calcaire et de NaCO_3 permettaient d'obtenir des alcalinités élevées beaucoup plus rapidement (ou avec un ratio poudre/eau de mer moins important), alors que la poudre d'olivine présentait des résultats assez similaires à la poudre de coquille d'huître.

A partir de ces résultats a été défini un protocole d'alcalinisation de l'eau de mer spécifique à chaque minéral alcalin utilisé (voir tableau 4).

Tableau 3 Essais de dissolution avec trois différents minéraux dans des piluliers de 45 ml à pH 5 (Exp.0).

Quantité (g)	Temps (h)	A_T Olivine	A_T Calcaire	A_T NaCO_3
1	2	4579	14956	Trop élevée
3	1	5160	15277	Trop élevée

Tableau 4 Paramètres d'alcalinisation d'eau de mer pour 600ml de solution alcaline (A_T finale = 11 000 à 15 000 $\mu\text{mol/L}$) (Exp.0).

	Coquilles d'huîtres	Olivine	NaCO_3	Calcaire
Quantité	30g	80g	0,3g	21g
Durée	1h15	2h30	5min	<1h
pH	5	5	5	5
Options	Bullage CO_2 Agitation	Agitation	Non	Non

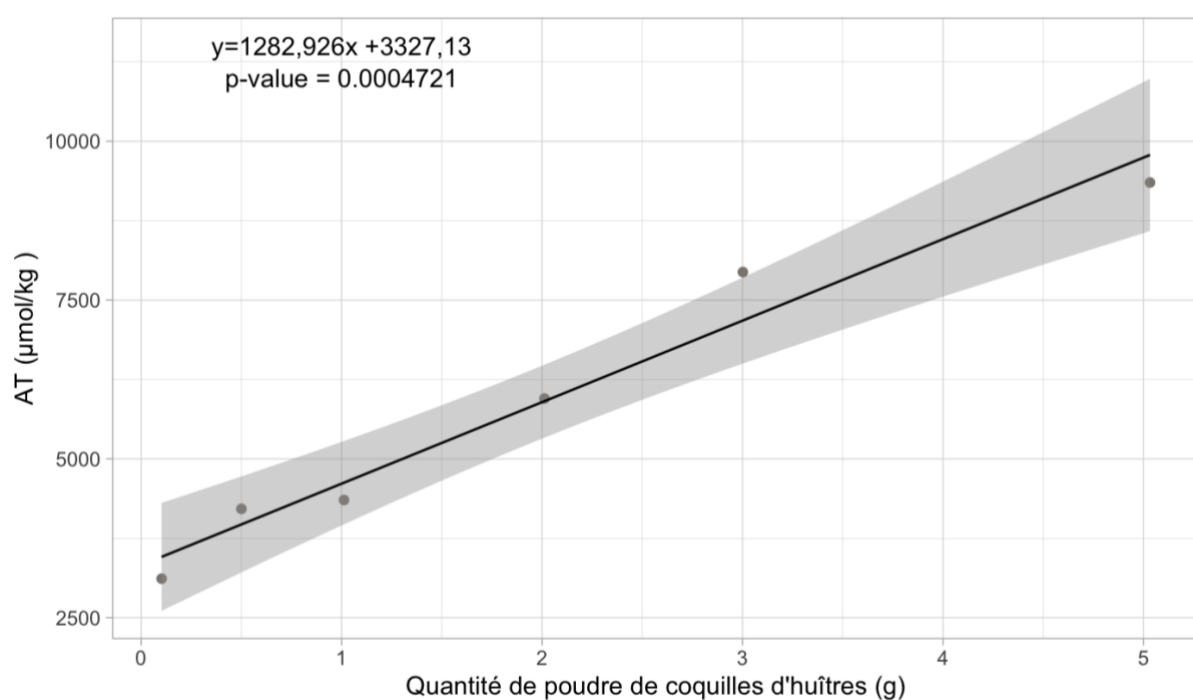
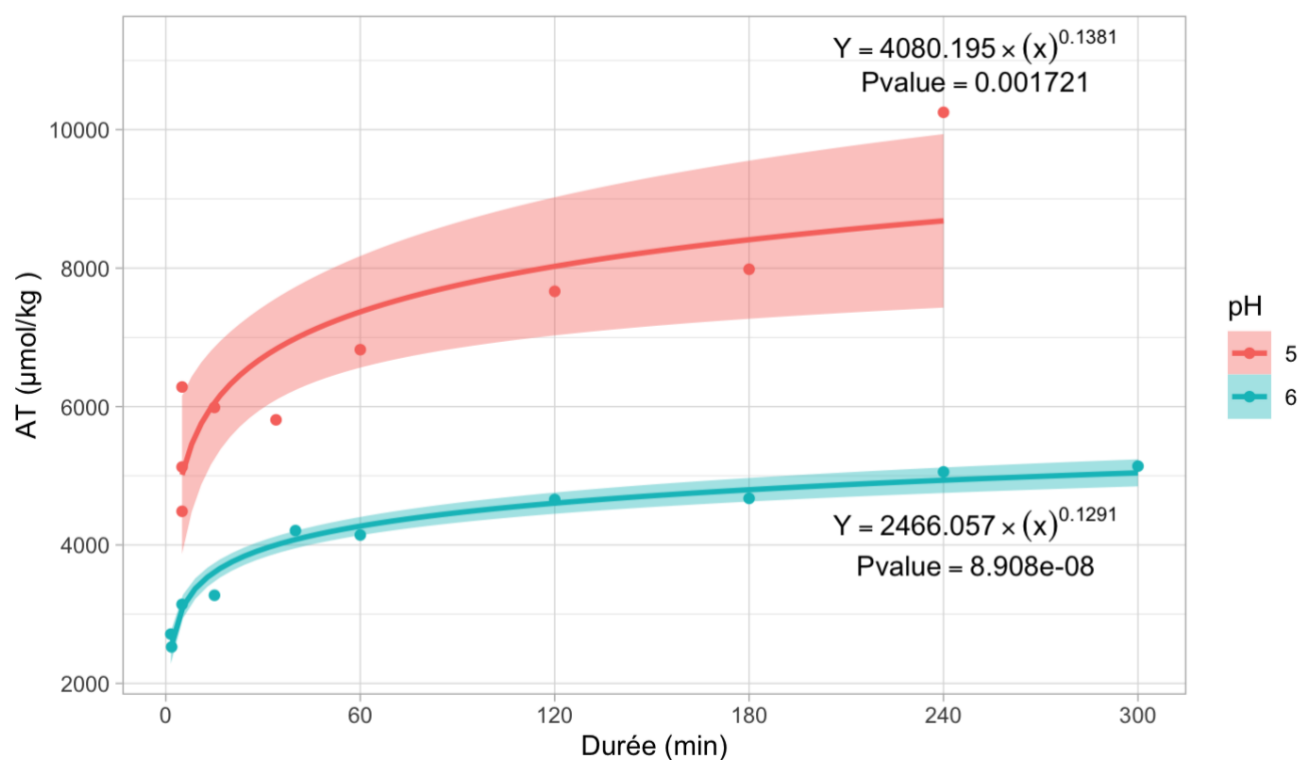


Figure 4 Effets du pH (en haut) et du ratio minéral/eau de mer (en bas) sur la dissolution de la poudre d'huître. Les expérimentations sont réalisées en pilulier de 45ml, sans agitation (Exp.0).

Mesure des normes de réaction de l'huître creuse vis-à-vis de l'alcalinité (Exp. 1-6)

Les figures ci-dessous illustrent l'effet de l'alcalinité sur la normalité (%) et la longueur des coquilles (μm) pour différents matériaux : coquilles d'huîtres, olivine, calcaire, et carbonate de sodium. Les résultats sont présentés pour cinq lots différents, identifiés par les numéros 1, 3, 4, 5, et 6, le lot 2 n'ayant pas abouti. Le tableau 5 résume les paramètres des régressions linéaires pour chacun des lots : l'estimation de la pente (Estimate), la valeur p (Probt), et le coefficient de détermination (R^2). Les estimations de pentes montrent des coefficients de pente très faibles car les ordres de grandeurs entre x et y sont très différents et ont donc été transformés pour une meilleure lisibilité. On notera cependant qu'ils sont tous négatifs ou nuls.

1. Effets sur les anomalies morphologiques

Les larves d'huîtres creuses ne semblent pas être impactées de manière identique en fonction des sources d'alcalinité. Seuls les individus exposés à de l'olivine semblent impactés de manière significative et les résultats sont assez homogènes en fonction des lots : on atteint 0 % de normalité aux niveaux d'alcalinité les plus élevés. Avec un R^2 d'environ 80 % pour ces droites de régression, cela montre que le modèle explique bien la variabilité observée : 80 % de la variabilité des données est expliquée par le facteur alcalinité issue d'olivine. Pour la condition coquilles d'huîtres, seulement la régression du lot 6 montre une interaction négative avec l'alcalinité, avec un coefficient de pente aussi important que pour l'olivine. Les autres lots montrent soit une absence d'impact, soit une variabilité trop importante pour conclure. Les expositions au calcaire ou au NaCO_3 ne relèvent pas d'effets de l'alcalinité sur les taux de normalités. On observe enfin une certaine variabilité entre les lots. Le lot 5 présente notamment des taux de normalité très bas pour certaines conditions avec une normalité inférieure à 50% pour la condition témoin des séries coquilles d'huîtres et calcaire, il est donc difficile de conclure sur la raison de ces taux très bas. On retrouve cette problématique liée au lot 5 dans les analyses des tailles des larves.

2. Effets sur la longueur de la coquille

Les résultats issus des mesures des larves d'huîtres creuses semblent montrer des tendances assez similaires aux résultats des taux de normalité. Bien que les régressions sur l'exposition à l'olivine ne soient pas toutes significatives (1/3 contre 3/3 pour la normalité), la croissance des larves semble impactée. Les témoins sont en moyenne $5\mu\text{m}$ plus grand que les conditions $A_T = 11\,000\,\mu\text{mol/L}$. Les résultats concernant la condition poudre de coquilles d'huîtres montrent à nouveau un niveau de bruit élevé mais deux régressions sur cinq montrent une interaction négative de l'alcalinité sur la taille. Les analyses avec le calcaire et le Na_2CO_3 ne suggèrent à nouveau pas de relation avec l'alcalinité. Le lot 5 montre une interaction négative significative de l'alcalinité issue de calcaire sur la taille, mais le témoin de cette condition présente, comme pour les taux de normalités, une valeur anormalement basse qui pourrait indiquer un problème de croissance intrinsèque au lot et non aux conditions.

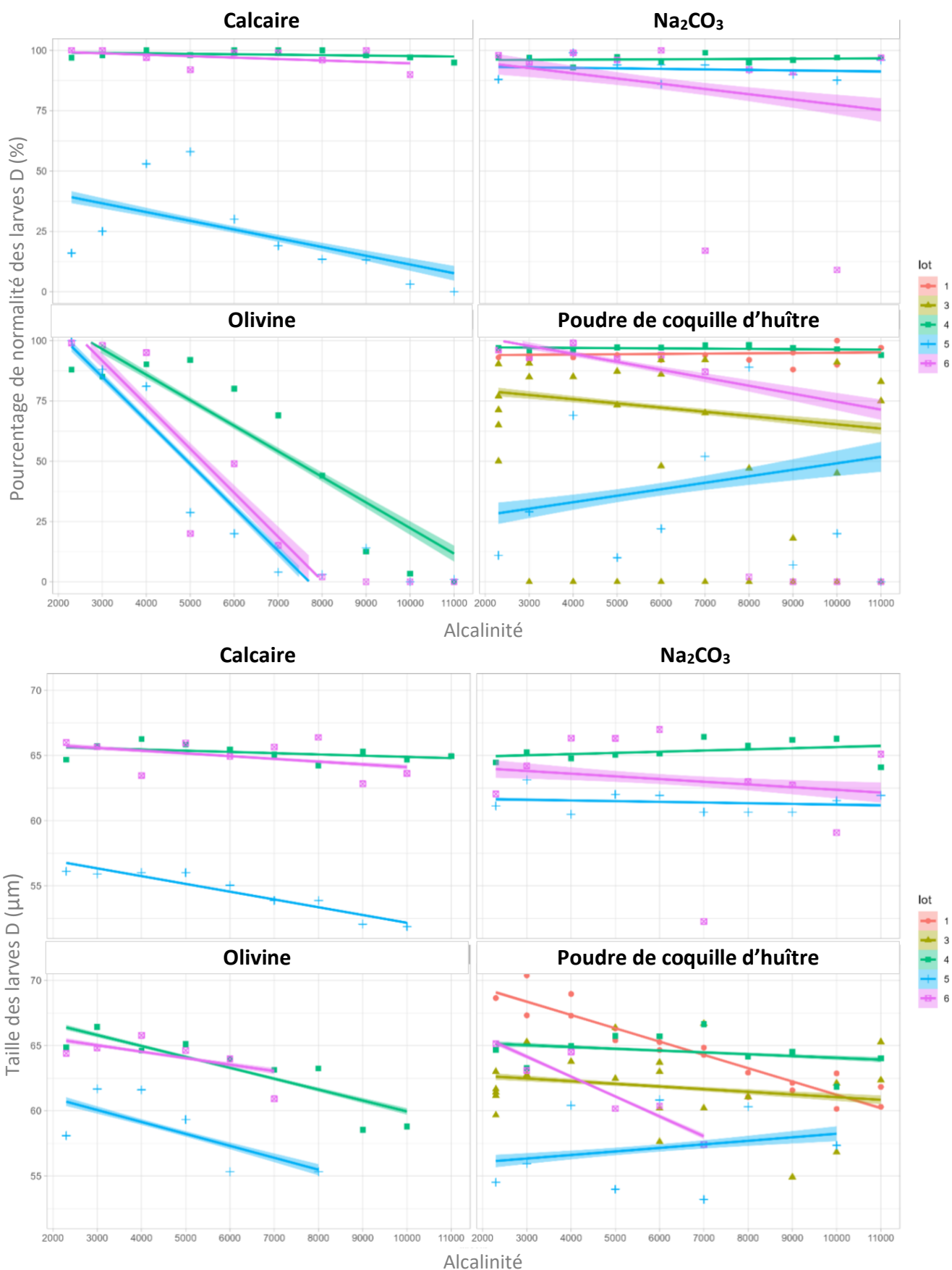


Figure 5 Relations des taux de normalité et longueurs des coquilles par rapport aux différentes expositions alcalines. Chaque point représente respectivement un taux sur $n=100$ individus et une longueur de coquille moyenne sur $n=50$ individus. Les lots sont décrits dans le tableau 1 et 2(Exp.1-6)..

Tableau 5 Résultats statistiques d'ajustements de modèles linéaires sur le taux de normalité et la taille des larves en fonction de l'exposition et la source à l'alcalinité. Les résultats en orange mettent en avant les corrélations significatives ($P\text{value} < 0,05$) (Exp.1-6).

Minéral	Lot	Normalité			Taille des larves		
		Estimate (.10 ⁻³)	Probt	R2	Estimate (.10 ⁻³)	Probt	R2
Calcaire	4	0	0,36	0,1	-0,09	0,18	0,21
	5	0	0,05	0,39	-0,6	0	0,89
	6	0	0,25	0,18	-0,21	0,25	0,19
Olivine	4	-10	0	0,86	-0,9	0	0,78
	5	-10	0	0,79	-0,96	0,12	0,49
	6	-10	0	0,81	-0,65	0,12	0,49
Coquilles d'huîtres	1	0	0,71	0,02	-1,01	0	0,95
	3	0	0,2	0,2	-0,4	0,25	0,16
	4	0	0,48	0,07	-0,14	0,41	0,09
	5	0	0,71	0,02	0,27	0,59	0,05
	6	-10	0	0,77	-1,53	0,01	0,85
NaCO4	4	0	0,69	0,02	0,09	0,36	0,11
	5	0	0,69	0,02	-0,05	0,6	0,04
	6	0	0,27	0,15	-0,32	0,54	0,05

3. Résultats des analyses ETM

Une partie des échantillons devait être analysée pour quantifier les éléments trace métalliques présent dans les différentes conditions des bio-essais. Du fait des congés d'été, seuls les ions majeurs ont été quantifiés avant la fin de ce rapport. Dans le graphique page suivante on retrouve les ions présents aux taux détectables par le laboratoire ayant fait les analyses : la figure présente l'évolution des concentrations de différents éléments en fonction de l'alcalinité (TA) pour le témoin et les différents types de minéraux : calcaire, Na₂CO₃, olivine, poudre de coquille d'huître. La liste totale des éléments analysés est présentée ci-dessous :

- Non détectés : Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, P, Pb, Sb, Sc, Ti, V, Zn
- Détectés : B, Ba, Ca, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, S, Si, Sr

Observations graphiques principales :

Bore (B) : Le bore reste relativement stable à travers les différents minéraux, avec seulement une légère baisse avec l'augmentation de l'alcalinité issue de l'olivine.

Baryum (Ba) : Le baryum présente une faible augmentation avec l'alcalinité issue d'olivine, et a une concentration nulle pour les autres minéraux.

Calcium (Ca) : Le calcium montre une légère augmentation dans les conditions avec calcaire et coquille d'huître, ce qui est attendu étant donné que le calcaire et la coquille d'huître sont des sources de calcium. Cette augmentation est moins marquée pour les autres minéraux.

Fer (Fe) : Le fer n'a été détecté que deux fois (le reste des résultats présente une marge d'erreur trop importante) et uniquement dans le lot 3 pour les conditions d'alcalinité les plus élevées avec le carbonate de sodium et le calcaire.

Potassium (K) : Le potassium présente des résultats très hétérogènes, la variabilité inter-lot est trop importante pour conclure.

Lithium (Li) : Le lithium montre des résultats assez stables par rapport au témoin, sauf dans le lot 3 où il augmente très faiblement en condition olivine et poudre d'huître.

Magnésium (Mg) : Le magnésium présente une légère augmentation avec l'alcalinité issue de l'olivine pour les lots 2 et 3 et de la poudre de coquille d'huître pour le lot 1.

Manganèse (Mn) : Le manganèse présente une tendance à l'augmentation avec l'alcalinité, en particulier avec l'olivine la poudre de coquille d'huître et le calcaire.

Sodium (Na) : Le sodium montre des variations moins prononcées, ses taux sont plutôt similaires aux témoins.

Soufre (S) : Le soufre reste relativement stable avec une légère augmentation observée pour la poudre d'huître dans le lot 1.

Silicium (Si) : Le silicium montre une légère augmentation en fonction de l'alcalinité issue d'olivine, ce qui est attendu étant donné la présence de Si dans ce minéral.

Strontium (Sr) : Le strontium présente des variations très faibles, avec une légère tendance à l'augmentation avec l'alcalinité issue d'olivine ou de coquille d'huître selon les lots.

Il est important de noter la variabilité entre les différents lots (1, 2, 3) pour chaque élément, indiquant que la réponse chimique à l'alcalinité n'est pas seulement liée au type de minéral mais aussi aux spécificités des lots eux-mêmes.

En résumé, la figure montre que l'olivine et, dans une moindre mesure, la poudre de coquille d'huître sont les matériaux les plus réactifs sous conditions d'alcalinité élevée, avec des augmentations des concentrations d'éléments comme le baryum, le lithium, le magnésium, le manganèse, le soufre, le silicium et le strontium. Le calcaire et le Na_2CO_3 semblent montrer des effets de manière moins récurrente.

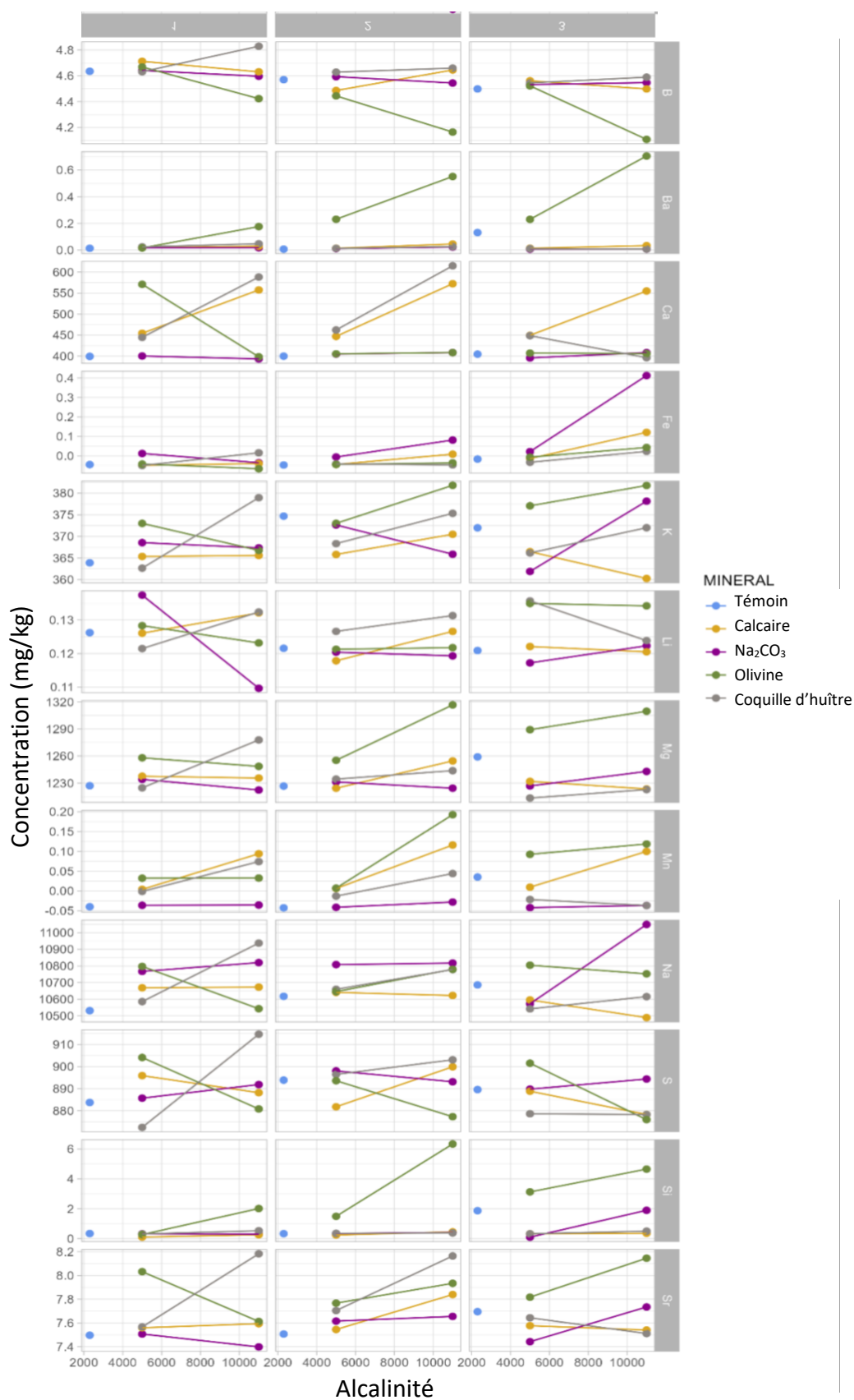


Figure 6 Évolution des concentrations de différents ETM en fonction de l'alcalinité (TA) et du lot pour le témoin et les différents types de minéraux : calcaire, Na₂CO₃, olivine, poudre de coquille d'huître.

Mesure de l'effet familial sur la résistance de l'huître creuse vis-à-vis de l'alcalinité (exp. 7)

Seuls les minéraux les plus impactants ont été retenus dans cette expérimentation. Le graphe 7 présente les taux de normalités obtenus après exposition à de l'alcalinité issue d'olivine et de la poudre de coquille d'huître. La figure montre que l'augmentation de l'alcalinité réduit la normalité des larves d'huîtres (les taux sont de 80% aux condition témoins et à moins de 10% pour $A_T = 9000 \mu\text{mol/L}$), avec une interaction significative entre le type de minéral et l'alcalinité. Les larves exposées à l'olivine semblent être plus affectées par l'augmentation de l'alcalinité que les larves exposées à la poudre de coquille d'huîtres. Les intervalles de confiance montrent également la variation de cette relation entre les différentes familles, soulignant ainsi la variabilité biologique. Les taux de normalité étant souvent inférieur à 50%, les mesures de tailles de larves ont souvent été impossibles, ces résultats ne sont donc pas présentés ici mais disponibles en annexe.

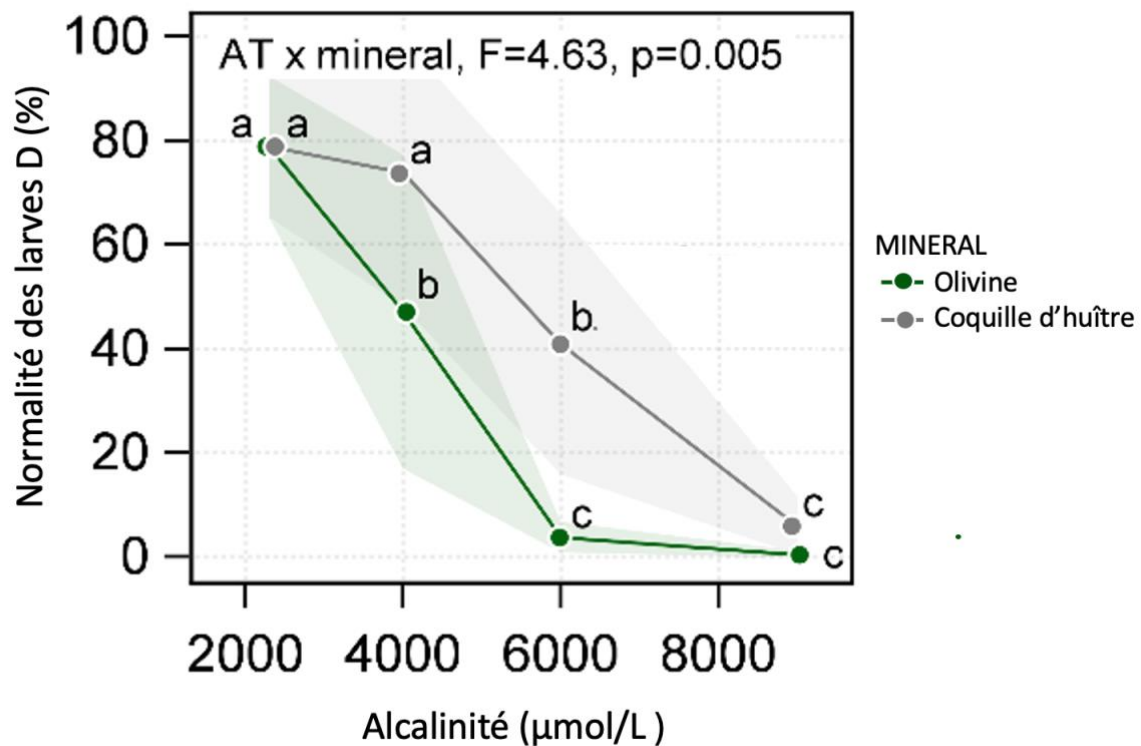


Figure 7 Relations des taux de normalité des larves D par rapport aux différents niveaux d'expositions et de source d'alcalinité. Chaque point représente la moyenne des taux calculés sur les 10 familles pour chaque minéral. Les lettres indiquent les différences significatives ($P\text{value} < 0,05$)(Exp. 7)

Mesure de l'effet d'une exposition précoce à alcalinité élevée sur le développement larvaire ultérieur (exp. 1BIS)

1. Résultats des tailles de larves d'huîtres creuses

Les mesures de tailles des larves d'huîtres creuses ont été effectuées à J2, J6, J9 et J14 et à J26, cette dernière valeur a été écartée pour n'étudier que le cycle larvaire et non le stade naissain. La figure présente donc la longueur de la coquille (en micromètres) des larves d'huîtres creuses en fonction de leur âge (en jours). Les flûtes sont regroupées pour former les deux conditions d'expérimentation : les larves ayant eu un stress alcalin et le groupe témoin. Dans le tableau 6 on retrouve pour chaque date les mesures moyennes de chaque condition et l'écart de taille entre les deux. Les deux groupes montrent une croissance assez similaire de la coquille, mais on retrouve des différences à certains âges (jours). D'après le tableau 6, les conditions ont un écart de 5µm en faveur du témoin au sortir de la phase en bécier où l'exposition alcaline a lieu pour la condition alca. Cette différence de taille devient significative à J6, se creuse à J9 où l'écart de taille est le plus grand (11µm de moins pour la condition stress alcalin) et finit par disparaître à J14 avant la fixation. Les résultats sur la consommation algale présents en annexe 2 montre également un écart d'alimentation entre les deux groupes.

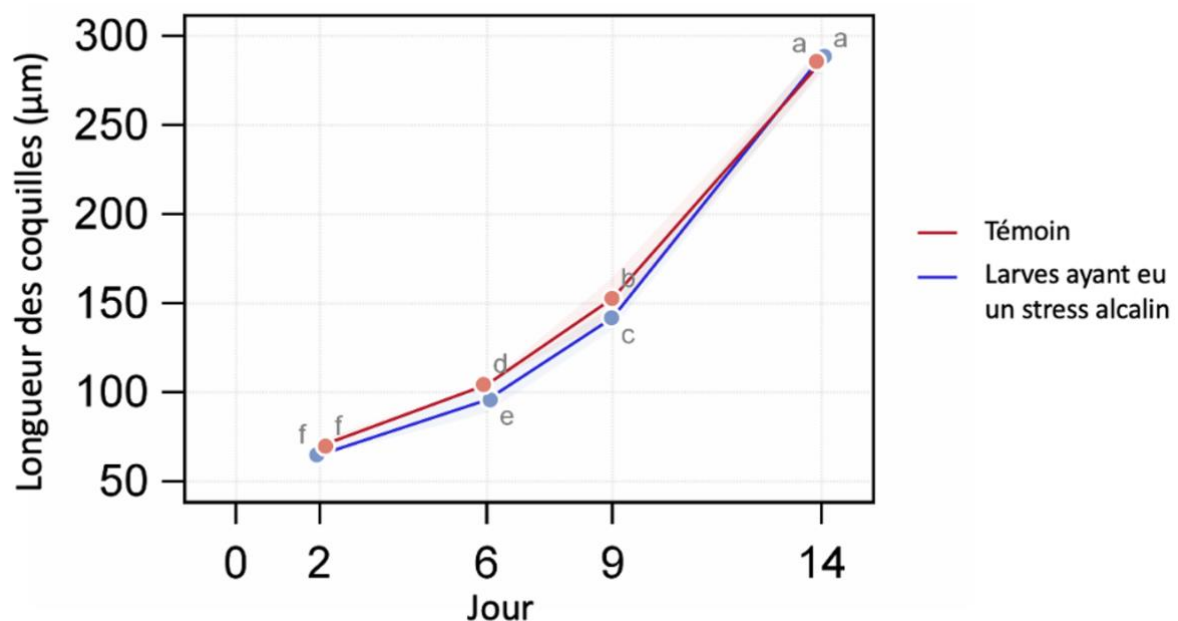


Figure 8 Évolution de la longueur des coquilles de larves d'huîtres durant les 14 jours d'élevage larvaire selon le traitement alcalin ou non durant les 48h premières heures de transformation. Chaque point représente la moyenne des tailles mesurées sur 50 individus dans 3 flûtes par condition. Les lettres indiquent les différences significatives entre les deux groupes expérimentaux (Pvalue <0,05) (Exp. 1BIS)

Tableau 6 Longueurs moyennes des larves d'huîtres par condition et écart entre les conditions selon le jour (Exp. 1BIS)

Jour	Témoin	Alca	Écart
2	69,82	65,05	4,86
6	104,55	95,87	8,55
9	152,84	141,79	11,39
14	285,83	288,77	-2,79

2. Taux calculés durant le développement larvaire de l'huître creuse

Les différents taux calculés durant l'élevage larvaire (phase larvaire et phase juvénile) sont représentés dans la figure 9. On retrouve une différence significative sur le taux de fixation (71% de fixation pour les témoins contre 45% pour la condition alcaline) et une légère différence sur la survie totale avec en moyenne 27% de survie pour les témoins et 10% de survie pour la condition alcaline (Pvalue = 0,087). L'exposition alcaline durant les premières 48h ne semble pas impacter les taux d'éclosion, de larves œillées et de survie larvaire.

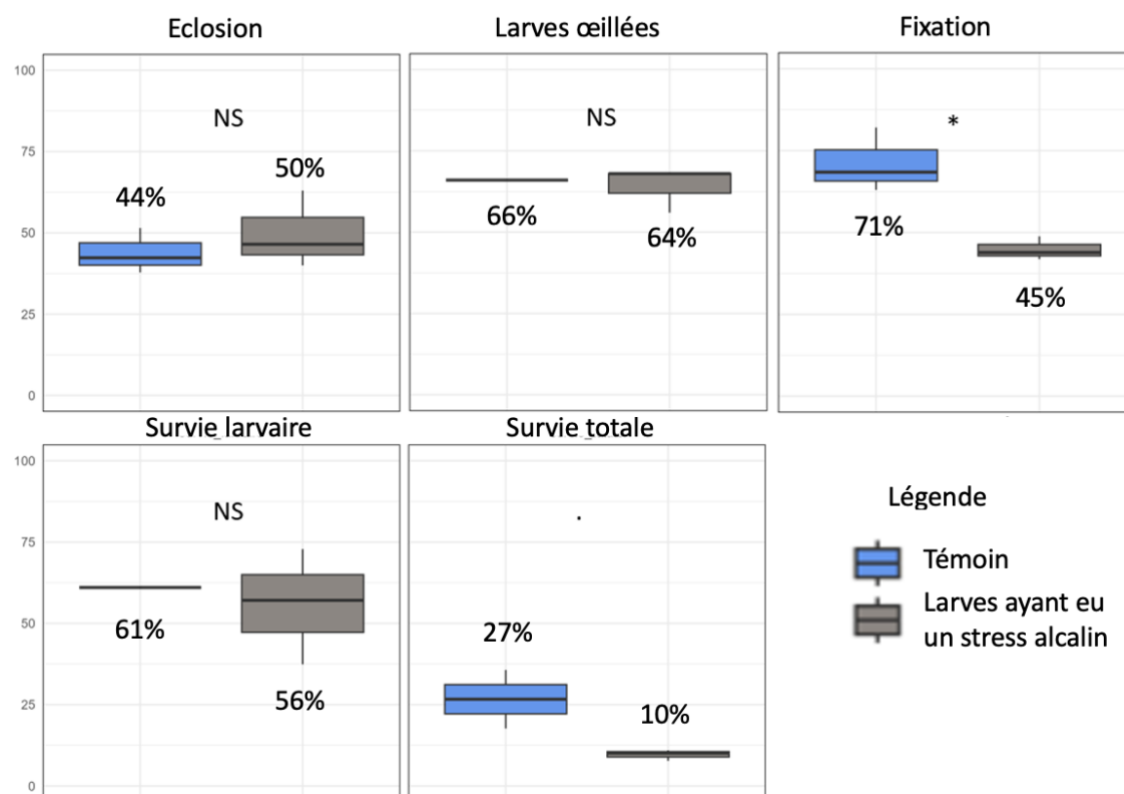


Figure 9 Taux calculés durant le développement larvaire de l'huître creuse (Exp. 1BIS)

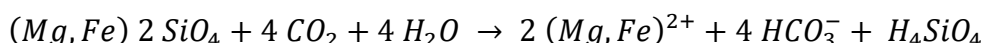
Discussion

L'objectif de cette étude était d'étudier les méthodes d'alcalinisation de l'eau de mer et de mesurer les impacts sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse. Les expérimentations effectuées ont permis l'élaboration de protocoles d'alcalinisation de l'eau de mer pour quatre matériaux différents donnant des solutions d'environ 11 000 $\mu\text{mol/L}$ d' A_T qui restent stables dans le temps. Les expositions larvaires ont montré des effets variés selon la source de l'alcalinité, allant d'une absence d'impact à une grande toxicité.

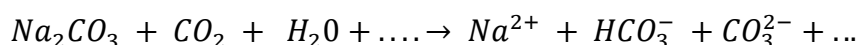
Mise en place des protocoles d'alcalinisation de l'eau de mer

Les résultats obtenus montrent des grandes différences de rapidité et d'efficacité de l'OAE en fonction du matériel choisi, du pH initial de l'eau, ou encore du fait d'agiter la solution. Pour rappel, l'augmentation de l'alcalinité est directement liée à la dissolution de matériaux alcalins et donc à la libération dans le milieu des particules alcalines (voir équation 7). La dissolution est un processus physico-chimique qui dépend en premier lieu de la taille des particules : plus les particules sont petites et plus la surface d'échange avec le liquide est grande (Anbeek, 1992). Dans le cas présent, les matériaux utilisés n'ont pas la même granulométrie : 200-300 μm pour la poudre de coquille d'huître, 63-1400 μm pour l'olivine, <100 μm pour le calcaire (non connue pour le carbonate de sodium), ce qui explique en partie les différentes vitesses de dissolution. L'agitation permet au mélange eau/matière alcaline d'être le plus homogène possible et favoriser encore une fois sa surface d'échange. Les variations liées au pH sont, elles, expliquées par le système des carbonates et les équations 4 et 5 présentées dans l'introduction. Le calcaire par exemple (équation 5) libère en se dissolvant des ions carbonates. Si le milieu est acide, et donc riche en ions hydrogènes, les ions carbonates se transforment en ion bicarbonates. Ainsi baisser le pH permet de diminuer la saturation en ions carbonates et favorise la dissolution du calcaire. Il en va de même pour les autres matériaux (voir équations ci-dessous), et pour la poudre de coquille d'huître qui est composé majoritairement de CaCO_3 (sous forme calcite) (Bayne, 2017).

Équation 7 Dissolution de l'olivine (Fuhr et al., 2022)



Équation 8 Dissolution du carbonate de sodium (Khesghi, 1995)



La stabilité dans le temps de l'alcalinité des échantillons est en grande partie due à l'absence de précipitation (pour rappel chaque échantillon destiné au titre est filtré afin de retirer ces éventuelles précipitations). Ce phénomène correspond à la réaction chimique opposée à la dissolution, l'alcalinité dissoute devient particulaire. Cependant, pour précipiter, le calcaire a besoin de nuclei, particules qui sont retirées des échantillons lors de leur filtration sur filtre GF/F (Schulz et al., 2023).

L'OAE est une stratégie plutôt émergente encore peu étudiée à l'heure actuelle et peu d'expérimentations sur la dissolution de matériaux alcalins ont donc été publiées. De plus, pour que l'OAE soit reproductible à grande échelle, elle doit être la moins énergivore et coûteuse possible. Dans le cas de la méthode de l'accélération de l'érosion, l'objectif n'est

donc pas de produire des solutions alcalines comme présenté ici mais d'ajouter en milieu côtier ou océanique des minéraux broyés directement dans l'eau. (Eisaman et al., 2023) La méthode d'alcalinisation utilisée ici est donc accélérée par rapport à un système à grande échelle afin de simuler des niveaux d'alcalinité élevés. Dans Fuhr et al., (2022), un essai a été réalisé en laboratoire sur la dissolution de l'olivine. L'expérimentation est réalisée avec de l'eau de mer artificielle à pH 8 et du sable ultramafique (75% d'olivine, 100-125µm), à différents ratios minéral/eau (200 ml d'eau pour 20, 10 et 5g de sable). Une agitation est maintenue durant les 134 jours d'expérimentation et les échantillons sont maintenus hermétiquement fermés avec un volume d'air de 50ml, faiblement modifié que lors des prélèvements. La valeur maximale d'alcalinité mesurée lors de cette manipulation s'élève à 2650 µmol/L après 1 jour de contact, sur le bac ayant le ratio le plus élevé. Passé le premier jour, l'alcalinité décroît, à cause de précipitation selon l'hypothèse mise en avant par l'auteur. Bien qu'étant sur une échelle de temps différente, cette expérimentation corrobore certains résultats de la présente étude. Sur une durée équivalente inférieure à 1 jour, l'alcalinité est croissante, reste très faible à pH élevé, et est favorisée par un ratio minéral/eau élevé.

Cette étude avait pour but de produire de l'eau alcaline afin de réaliser des tests de toxicité sur faune marine. Les expérimentations sur la dissolution réalisées dans le cadre de cette étude n'ont donc pas été spécialement axés sur la performance de l'alcalinisation mais plutôt sur la facilité de mise en place.

Les impacts de l'alcalinité sur les larves d'huître creuse

1. Effets de l'alcalinité sur la phase embryo-larvaire de l'huître creuse

Les résultats de cette étude mettent en avant l'impact différencié de l'alcalinité en fonction des matériaux utilisés sur le développement des larves d'huîtres creuses. En particulier, l'exposition à l'olivine a montré un effet significatif sur les taux de normalité et les tailles de larves, avec une réduction drastique de la normalité à des niveaux élevés d'alcalinité et une diminution plus modérée des longueurs de coquille. La poudre de coquilles d'huîtres montre un effet moins marqué et les autres minéraux une absence d'effet dans la majorité des cas. Il a été choisi d'approfondir l'étude avec les minéraux les plus impactant lors d'une expérimentation avec 10 familles biparentales différentes. Cette expérimentation a permis de confirmer l'impact de l'olivine et de la poudre d'huître sur la croissance des huîtres.

Le changement dans la chimie des carbonates affecte les organismes quand le pH diminue. Même si très différente, l'OAE perturbe également l'équilibre du DIC de manière instable, rendant disponible ou non certaines molécules. Les impacts de ces changements sur ces organismes sont très documentés lorsqu'il s'agit de l'acidification des océans mais à contrario très peu étudiés et mal compris dans le cadre de l'OAE (Dupont & Metian, 2023).

Dans Gazeau *et al.* (2011), il a été observé que l'augmentation de l'alcalinité via l'ajout de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) n'engendrait pas de différence dans la superficie et la longueur des coquilles de larves d'huître creuses. La source d'alcalinité utilisée est très proche du carbonate sodium utilisé dans cette étude (Na_2CO_3) et montre une absence d'impact similaire pour un niveau d'alcalinité testé de 6726 µmol/kg. Il a même été démontré à contrario que l'augmentation de l'alcalinité pouvait être bénéfique aux êtres vivants

aquatiques. Dans l'étude d'Albright et al. (2016) il a été observé une augmentation de la calcification nette du récif d'environ 6,9 % suite à l'augmentation artificielle de l'alcalinité.

Enfin il a été relevé que le lot 5 présentait des anomalies importantes, avec des taux de normalité anormalement bas dans les conditions témoins. Ce phénomène pourrait suggérer un problème inhérent au lot, tel qu'une faible qualité initiale des œufs ou des conditions sous-optimales d'élevage, plutôt qu'un effet direct de l'alcalinité. Cela met en évidence l'importance de contrôler la variabilité biologique lorsqu'on interprète les résultats expérimentaux.

Petit focus sur les ETM

Cette variabilité d'impact pourrait être attribuée à la composition chimique spécifique des matériaux, qui pourrait affecter différemment le microenvironnement chimique des larves. La dissolution de minéraux n'amène en effet pas que de l'alcalinité dans l'eau de mer, et le dosage de ces coproduits pourrait expliquer partiellement la toxicité engendrée par cette méthode (Cyronak et al., 2023). L'analyse des ETM censée compléter cette étude n'est malheureusement pas terminée mais semble montrer de manière plus fréquente une augmentation de la concentration d'ETM dans les eaux alcalinisées avec de l'olivine ou de la poudre d'huître, ce qui pourrait confirmer que l'impact observé sur les larves d'huîtres n'est pas directement dû à l'alcalinité en elle-même. Cependant il est important de noter que ces analyses ont lieu sur les conditions, et non sur les individus. Il serait plus précis de doser la bioaccumulation des ETM au sein des individus pour statuer sur la présence et l'impact de ces polluants.

En comparant les résultats obtenus à d'autres études, on observe des différences concernant l'augmentation d'ETM avec l'olivine. Il est cité à plusieurs reprises dans le guide des bonnes pratiques sur la recherche sur l'OAE que l'olivine relargue du nickel lors de sa dissolution, ce qui n'a pas été observé dans cette étude (Eisaman et al., 2023). De plus, dans l'étude qui porte sur la dissolution déjà citée plus haut, il est mesuré des augmentations de manganèse, comme observé ici, mais également des augmentations de nickel (Fuhr et al., 2022), résultat également communiqué dans l'étude menée par Montserrat et al. (2017).

2. Impact d'un stress alcalin durant la phase embryo-larvaire sur la phase pélagique de l'huître creuse

L'observation d'une croissance réduite chez les larves exposées à l'alcalinité, notamment avec des écarts significatifs de taille à certains stades du développement (J6 et J9), indique que l'alcalinité pourrait perturber le développement précoce, même si cet effet tend à s'estomper à mesure que les larves approchent de la fixation. Cette fluctuation pourrait indiquer une résilience partielle des larves, bien que les impacts initiaux puissent avoir des conséquences sur leur survie et leur capacité à se fixer : les taux de fixations sont significativement différents entre le groupe témoin (71%) et le groupe ayant subi une exposition (45%). Cette différence lors de de cette phase de vie est critique, en effet le passage du stade pélagique au stade benthique est très sensible et énergivore, la larve doit trouver un substrat adapté et se transformer en naissain : son velum disparaît, ses glandes byssogènes secrètent le ciment nécessaire à la fixation, toute sa structure interne se réorganise pour

s'adapter à sa vie fixée (Bayne, 2017). Ainsi un impact sur le taux de fixation peut s'avérer très problématique pour la survie de l'huître creuse. Cependant il est à noter que le taux de survie totale calculée ne montre qu'une différence peu significative entre les deux groupes (27% pour le témoin contre 10% pour le groupe exposé).

Limites de l'étude et voies d'amélioration

1. Le système d'alcalinisation de l'eau

Le protocole établi lors de cette étude pour réaliser de l'eau alcaline n'a répondu que partiellement aux objectifs initialement prévus dans le contexte de ce stage. Bien que la méthode ait permis de réaliser de nombreux bio-essais en piluliers et donc de nous fournir de nombreux résultats sur les impacts biologiques, la portabilité de ce protocole à des manipulations de plus grande envergure est limitée. Travailler sur des plus grands volumes nécessite un nouveau matériel, et les ratios eau/minéraux utilisés pour des petits volumes ont tendance à être insuffisant. Le temps de filtration sur filtre de 0.2 μm peut également s'avérer dissuasif, un système reliant un filtre à cartouche de même caractéristique à une pompe plus puissante pourrait s'avérer une bonne alternative. Des essais de filtration de ce type ont montrés des résultats encourageants, mais uniquement via des cartouches filtrant à 1 μm , ce qui ne satisfait pas les recommandations du « *Guide to Best Practices for Ocean CO₂ Measurements* » (Dickson et al., 2007).

Le principal problème de ce protocole ne réside pas tant dans ces éléments mineurs, mais plutôt dans le fait qu'il ne permet pas de produire de l'eau en continu, empêchant ainsi la mise en place d'un système en flux ouvert. Il aurait pu être intéressant de renforcer l'attention de cette étude dans l'utilisation des réacteurs à alcalinité ou réacteurs à calcaire en stock sur la station d'Argenton, réacteurs qui sont utilisés dans le cadre de l'aquariophilie pour l'élevage de coraux qui ont besoin de carbonates pour leur croissance. Des essais ont été réalisés en début de cette étude avec un réacteur (ACM 122-152-202-202H AQUAVIE) mais les valeurs d'alcalinité obtenues n'étaient pas assez élevées pour les bio essais souhaités ($A_T < 3000 \mu\text{g/L}$). De plus le matériel calcaire utilisé n'étant pas le même que celui préconisé par le fabricant, des problèmes d'obstruction des filtres étaient observés, et les rendements étaient assez aléatoire. Une solution pour contourner la production d'eau alcaline en continu aurait pu être de constituer une réserve d'eau alcaline mais la production de gros volume était problématique comme expliqué plus haut.

Sur le plan expérimental, d'autres aspects auraient pu être améliorés. Premièrement, tous les paramètres physico-chimiques n'ont pas été pris en compte pour étudier l'alcalinisation de l'eau de mer. La salinité et la température de l'eau notamment, connus pour avoir un impact sur la spéciation du carbone inorganique dissous -et donc l'alcalinité-, n'ont pas été modifiés au cours des expérimentations et auraient pu être utile à une optimisation du protocole d'alcalinisation de l'eau de mer tout comme l'a été la modification du pH (Wolf-Gladrow et al., 2007). Enfin, dans un objectif de durabilité, certains des matériaux utilisés auraient pu être réutilisés. L'olivine, et la poudre de coquille d'huîtres notamment ne sont que partiellement dissous dans l'eau de mer lors du processus, et auraient pu être récupérés et réutilisés après un séchage à l'étuve. Cependant cela aurait pu altérer les rendements

d'alcalinisation, les plus petites particules étant déjà dissoutes lors du premier usage, la durée de dissolution des plus grosses particules aurait pu s'avérer dissuasive.

Le choix des matériaux utilisés pour l'alcalinisation de l'eau de mer est également discutable. Ainsi même si l'utilisation de coproduits de l'ostréiculture comme la poudre coquille d'huître semble être une solution durable, c'est le matériel qui demande ici le plus d'énergie pour être dissous efficacement (acidification de l'eau, agitation, durée la plus longue). L'olivine, qui dans cette étude nécessite un temps de dissolution assez proche de la poudre de coquille d'huître est également très énergivore lors de son extraction minière et peu disponible sur Terre. Le calcaire, plus souvent évoqué dans le contexte de l'OAE présente déjà plus de qualité : il est plus rapide à dissoudre, son taux quantité de minéral/eau de mer est faible et une grande partie des ressources en calcaire se situe sur les côtes et nécessitent donc moins de transport (Caserini et al., 2022).

2. Les expérimentations biologiques

La première limite de cette étude est qu'elle se base uniquement sur des mesures phénotypiques pour observer des changements chez les huîtres. Les mesures phénotypiques, telles que la taille, la forme, ou la croissance, fournissent des informations sur l'apparence et le développement observable, mais elles ne révèlent pas les mécanismes sous-jacents qui expliquent ces changements. En se limitant à ces observations, le risque est de passer à côté de processus biologiques essentiels, tels que les réponses physiologiques, génétiques, ou moléculaires, qui peuvent être cruciaux pour comprendre comment les huîtres réagissent à l'alcalinité. Pour obtenir une vision plus complète, il serait pertinent d'intégrer des analyses supplémentaires comme des mesures génétiques (par exemple, l'expression des gènes liés au stress ou à la calcification), des analyses biochimiques (comme les niveaux d'enzymes ou de protéines spécifiques), des caractérisations des réserves énergétiques, ou des évaluations physiologiques (comme les échanges gazeux en chambre métabolique). Comme dit en introduction, l'acidification des océans impacte grandement l'huître creuse sur une multitude d'aspect, il ne faut donc pas négliger l'impact que pourrait avoir l'alcalinité sur les mêmes points.

Se limiter à une étude d'impact sur le stade larvaire est également insuffisant, cela restreint la compréhension des effets à une petite partie des étapes de la vie de l'huître creuse. Les larves sont certes vulnérables et leurs réactions aux conditions environnementales peuvent révéler des réponses importantes à court terme, mais ces réponses ne reflètent pas nécessairement les conséquences à long terme sur la survie, la croissance, et la reproduction des individus adultes. En négligeant les stades post-larvaires, comme la phase juvénile ou adulte, on manque l'occasion d'observer comment les effets précoces influencent la robustesse, la résilience, et les capacités adaptatives des huîtres au fil du temps. Cependant étudier la réponse de l'huître à l'alcalinité durant d'autres stades de vie demande des volumes d'eau alcaline plus importants ou des systèmes à flux ouvert. Des essais d'élevages larvaires à plus petit volume (500ml contre 5L en salle d'élevage) ont été testés durant cette étude pour tenter d'adapter le système aux capacités de productions d'eau alcalines mais ces expérimentations n'ont pas donné de résultats permettant de mettre en place un système d'élevage fonctionnel. La survie des larves d'huître était lourdement impactée ainsi que la taille des individus (Annexe 4).

Enfin se limiter à un seul sujet d'étude tel que les huîtres réduit la portée des conclusions sur l'impact de l'alcalinité. Étudier d'autres organismes marins, tels que les moules, les palourdes ou les coraux, permettrait de mieux comprendre les effets variés de l'alcalinité sur les écosystèmes marins et d'obtenir une perspective plus complète et robuste.

Conclusion

L'étude a permis de mettre en place un protocole d'alcalinisation de l'eau de mer via quatre minéraux différents : la poudre de coquille d'huître, l'olivine, le calcaire et le carbonate de sodium. L'étude a également montré que l'alcalinisation de l'eau de mer pouvait avoir un impact sur le stade embryon-larvaire de l'huître creuse et que cela pouvait entraîner des conséquences sur les stades de vie ultérieures de l'huître creuse comme la fixation.

Cependant il a été mis en avant que l'alcalinisation de l'eau de mer avait un impact différent selon le choix du matériaux alcalin dissout. L'olivine et la poudre de coquille d'huître ont montré des impacts plus importants sur la croissance et la survie embryon-larvaire de l'huître creuse et il a également été observé que ces minéraux avaient tendance à relarguer plus facilement des ETM que le calcaire et le carbonate de sodium. La toxicité de l'alcalinisation ne serait ainsi pas due à l'alcalinité en elle-même mais plutôt de ses co-produits contenus dans les minéraux.

Ces expérimentations ne sont néanmoins pas suffisantes pour déterminer la toxicité sur l'huître creuse de l'OAE. Les résultats présentés sont d'une part dépendants des conditions expérimentales, qui ne représentent pas le milieu naturel de manière exacte et ne représentent en rien les conditions où pourrait être mis en place l'OAE. De plus, il faudrait approfondir l'étude en exposant le sujet d'études à l'alcalinité sur de plus longues durées et sur différents stades de vie.

Il apparait toutefois que le choix de la méthode d'alcalinisation de l'eau de mer doit se faire de manière réfléchie car les impacts peuvent grandement varier entre les différents minéraux dissous. La poudre de coquille d'huître, qui aurait pu sembler une source durable pour l'alcalinisation, montre des résultats de toxicité dissuasifs du fait des particules nocives ayant été bioaccumulées durant la vie de l'animal. Le calcaire, déjà présent sur le milieu côtier semble être une solution moins impactante.

Bibliographie

Agreste (2022). Conchyliculture en 2020 : baisse de la production d'huîtres, hausse pour les moules.

Agreste (2021). Enquête Aquaculture 2019.

Albright, et al. (2016). Reversal of ocean acidification enhances net coral reef calcification. *Nature*, 531(7594), 362-365. <https://doi.org/10.1038/nature17155>

Anbeek, C. (1992). The dependence of dissolution rates on grain size for some fresh and weathered feldspars. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(11), 3957-3970. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90009-8)

Bayne, B. L. (2017). *Biology of Oysters*. Elsevier Science. <https://univ.scholarvox.com/catalog/book/docid/88840540>

Calvin K., et al (2023). IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), DOI : 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647

Caserini, S., et al (2022). The Availability of Limestone and Other Raw Materials for Ocean Alkalinity Enhancement. *Global Biogeochemical Cycles*, 36(5), e2021GB007246. <https://doi.org/10.1029/2021GB007246>

Cyronak, T., et al (2023). Field experiments in ocean alkalinity enhancement research. *State of the Planet, 2-oae2023*, 1-13. <https://doi.org/10.5194/sp-2-oae2023-7-2023>

Dickson, A. G., et al (2007). *Guide to best practices for ocean CO2 measurements*. North Pacific Marine Science Organization.

Dupont, S., & **Metian**, M. (2023). General considerations for experimental research on ocean alkalinity enhancement. *State of the Planet, 2-oae2023*, 1-11. <https://doi.org/10.5194/sp-2-oae2023-4-2023>

Eisaman, M. D., et al (2023). Assessing the technical aspects of ocean-alkalinity-enhancement approaches. *State of the Planet, 2-oae2023*, 1-29. <https://doi.org/10.5194/sp-2-oae2023-3-2023>

Fuhr, M., et al (2022). Kinetics of Olivine Weathering in Seawater : An Experimental Study. *Frontiers in Climate*, 4. <https://doi.org/10.3389/fclim.2022.831587>

Gattuso, J.-P., & **Hansson**, L. (Éds.). (2011). *Ocean acidification*. Oxford University Press.

Gattuso J.-P. 2024. CRAN - Package seacarb. <https://cran.r-project.org/web/packages/seacarb/index.html> (Consulté le 18 avril 2024).

Gazeau, F., et al (2011). Effect of Carbonate Chemistry Alteration on the Early Embryonic Development of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *PLOS ONE*, 6(8), e23010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023010>

Kheshgi, H. S. (1995). Sequestering atmospheric carbon dioxide by increasing ocean alkalinity. *Energy*, 20(9), 915-922. [https://doi.org/10.1016/0360-5442\(95\)00035-F](https://doi.org/10.1016/0360-5442(95)00035-F)

Leung, J. Y. S., et al (2022). Is Ocean Acidification Really a Threat to Marine Calcifiers? A Systematic Review and Meta-Analysis of 980+ Studies Spanning Two Decades. *Small*, 18(35), 2107407. <https://doi.org/10.1002/sml.202107407>

Montserrat, F., et al (2017). Olivine Dissolution in Seawater : Implications for CO₂ Sequestration through Enhanced Weathering in Coastal Environments. *Environmental Science & Technology*, 51(7), 3960-3972. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05942>

NOAA Research. (2024, avril 5). *No sign of greenhouse gases increases slowing in 2023*. NOAA Research. <https://research.noaa.gov/2024/04/05/no-sign-of-greenhouse-gases-increases-slowing-in-2023/>

Oschlies A., et al (2023). Climate targets, carbon dioxide removal, and the potential role of ocean alkalinity enhancement. *State of the Planet*, 2-oae2023, p. 1-9. DOI : 10.5194/sp-2-oae2023-1-2023

Pernet F. et Gazeau F. (2024). *L'acidification des océans*. Versailles : Éditions Quae ISBN 978-2-7592-3781-4(Enjeux sciences).

Petton, B., et al (2013). Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 3(3), 257-273. <https://doi.org/10.3354/aei00070>

Plateforme océan & climat. 2015. *Acidification de l'Océan - Plateforme Océan & Climat*. <https://ocean-climate.org/sensibilisation/les-impacts-du-changement-climatique-sur-locean/> (Consulté le 18 avril 2024).

Schulz, K. G., et al (2023). Seawater carbonate chemistry considerations for ocean alkalinity enhancement research : Theory, measurements, and calculations. *State of the Planet*, 2-oae2023, 1-14. <https://doi.org/10.5194/sp-2-oae2023-2-2023>

Wolf-Gladrow, D. A., et al (2007). Total alkalinity : The explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Marine Chemistry*, 106(1), 287-300. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.01.006>

Zeebe, R. E. (2012, mai 2). *History of Seawater Carbonate Chemistry, Atmospheric CO₂, and Ocean Acidification* (world) [Review-article]. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-042711-105521>; Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-042711-105521>

Annexes

Annexe 1 : Protocole détaillé

Protocole d'exposition embryo-larvaire à différents niveaux d'alcalinité

Objectifs

Dans le cadre de l'acidification des océans, le renforcement de l'alcalinité est étudié autour de deux objectifs : favoriser la dissolution de CO₂ et donc augmenter le potentiel de puit de carbone de l'océan et lutter contre l'acidification qui met en difficulté les organismes et modifie la chimie des carbonates sur laquelle se base la bio minéralisation des organismes calcifiants. Cependant, quelle que soit la méthode utilisée pour renforcer l'alcalinité, les lieux où elle serait mise en place atteindrait des valeurs bien plus élevées que d'ordinaire. Il est donc nécessaire de s'assurer que ces pics de concentration ne soient pas néfastes aux organismes, notamment sur les stades les plus sensibles, les stades embryo-larvaires.

Nous allons donc tester dans cette expérience l'impact de différents niveaux d'alcalinité sur les larves d'huître de C. Gigas en observant leur survie ainsi que leur développement (présence de malformation, croissance) en petits volumes et en dupliques. Nous allons également nous concentrer sur la mémoire du stress en regardant l'impact potentiel d'une exposition à une alcalinité très forte durant la phase embryo-larvaire en gros volume en tripliques sur les stades de vies postérieurs.

Les paramètres maintenus constants sont les autres caractéristiques physico-chimiques de l'eau pouvant avoir un impact sur le développement (pH, température, oxygénation), ainsi que la lumière et l'alimentation.

En témoin nous utiliserons de l'eau de mer non modifiée, soit avec une alcalinité totale (TA) autour de 2300 $\mu\text{mol/kg}$.

Matériel expérimental

Titreur d'alcalinité

L'utilisation d'un titreur est ici indispensable car il permet de contrôler notre variable d'étude, l'alcalinité. Il est calibré avant manipulation avec des tampons tris et des tampons à pH 4 et pH 7. Avant chaque série de manipulation, l'acide est renouvelé, et un titrage sur eau de mer naturelle est effectué afin de repérer d'éventuelles anomalies.

Sonde multi-paramètres

Une sonde multi-paramètres est également utilisée pour surveiller durant toutes les étapes de la préparation des échantillons la température de l'eau, sa salinité, son pH et son oxygénation.

Micro brisure d'huître

Afin d'obtenir une eau très alcaline, différents minéraux carbonatés peuvent être dissous dans l'eau de mer telle que l'olivine ou encore le calcaire contenu dans les coquilles des coquillages comme les huîtres. Les coquilles étant un coproduit abondant de la conchyliculture, il paraît pertinent de l'utiliser dans le cadre du renforcement de l'alcalinité des océans.

Rampe de filtration

Il est recommandé d'utiliser pour les tests embryo-larvaire de l'eau de mer préalablement filtrée à 0.2µ. La fabrication de l'eau alcaline qui se fait via la dissolution de micro brisure doit aussi être filtrée afin d'éliminer le calcaire particulaire et garder uniquement le dissous responsable de l'alcalinité.

Préparation d'eau de mer à différentes alcalinités

De l'eau de mer est préalablement acidifiée via un bullage de CO2 jusqu'à pH 5 et supplémentée en micro brisures d'huîtres qui vont venir se dissoudre dans l'eau acidifiée et augmenter l'alcalinité. On va ainsi obtenir une solution mère très alcaline, que l'on viendra filtrer avec la rampe de filtration. Une fois cette solution mère obtenue, on la remonte à pH 8 via un bullage d'oxygène. En parallèle, on prépare l'eau de mer qui nous servira de diluant. Cette eau est elle aussi filtrée, et réoxygénée si besoin (100% d'oxygène)¹. On vient ensuite titrer ces deux solutions pour obtenir nos valeurs d'alcalinité nécessaires à nos calculs de dilutions.

Équation 1 Calcul des dilutions

$$C_{\text{sol alcaline}} * V_{\text{sol alcaline}} + C_{\text{diluant}} * V_{\text{diluant}} = C_{\text{sol fille}} * V_{\text{sol fille}}$$

Dans les Tableau 1 et Tableau 2, pour chaque niveau d'alcalinité souhaité est calculé via l'Équation 1 le volume de solution alcaline à diluer avec le volume d'eau de mer filtrée. On utilisera au choix des micropipettes 1-10ml ou une burette graduée de 50ml. On gardera un des piluliers de chacune des solutions filles obtenues pour dosage afin d'avoir les valeurs réelles d'expérimentation.

Tableau 1 Exemple d'une gamme de dilutions pour les piluliers

solution mère alcaline :		solutions filles :				piluliers de 45ml :	
TA (µmol/kg)	13854	TA (µmol/kg)	volume (ml)	alca (ml)	diluant (ml)	alca (ml ar. à l'u)	diluant (ml ar. à l'u)
		2331	135	0,000	135,000	0	45
		3000	135	7,838	127,162	3	42
		4000	135	19,554	115,446	7	38
		5000	135	31,269	103,731	10	35
		6000	135	42,985	92,015	14	31
		7000	135	54,701	80,299	18	27
		8000	135	66,416	68,584	22	23
		9000	135	78,132	56,868	26	19
		10000	135	89,848	45,152	30	15
		11000	135	101,563	33,437	34	11
		total :		492,305	722,695		

Tableau 2 Exemple de dilution pour les gros volumes

solution mère alcaline :		solutions filles :				bêcher d'1L	
TA (µmol/kg)	13854	TA	volume final	alca (ml)	diluant (ml)	alca (ml ar. à l'u)	diluant (ml ar. à l'u)
		11000	3000	2256,964	743,036	752	248
		total :		2256,964	743,036		

Larves et embryons

Pour cette expérience on souhaite observer le développement embryo-larvaire, on doit donc ensemençer dans nos solutions des œufs tout juste fécondés, à raison d'environ 60 embryons par ml pour les tests en pilulier et 200 par ml en gros volume. Avec les modalités choisies dans les tableaux 1 et 2, on obtient un nombre total de 60*45*2*10+200*3000= 1 254 000 embryons.

¹ Pour un dispositif irréprochable, l'eau de mer servant de diluant devrait subir exactement les mêmes manipulations inhérentes à l'alcalinisation de l'eau. Il conviendrait donc d'acidifier cette eau de mer elle aussi à pH 5 et la ramener à pH 8 via les mêmes méthodes.

Si l'on souhaite éliminer dans notre expérience la responsabilité génétique on peut venir tester deux familles à raison d'une familleensemencée par dupliqua.

Conditionnement des échantillons

Comme dit précédemment les échantillons seront conditionnés dans des piluliers d'environ 50ml, on utilisera ici des piluliers en plastique à fond plat, que l'on recommande de mariniser avant d'y ajouter nos solutions.

L'expérience concernant la mémoire du stress alcalin nécessite lui des plus gros volumes, on aura donc besoin de b cher d'1L, trois pour les témoins et 3 pour les larves exposées. 6 flûtes d'élevage seront ensuite nécessaires pour le développement larvaire deux jours après l'incubation.

Microscope

Procédure

Facteur d'étude : l'alcalinité

L'alcalinité totale en mer d'Iroise, lieu de l'étude, se situe aux alentours de 2300 $\mu\text{mol/kg}$. Les plus hauts taux d'alcalinité pouvant être observés lors de la dissolution de calcaire à pH 5 en moins d'une heure sont estimés à 11 000 $\mu\text{mol/kg}$. On souhaite mesurer l'impact de 10 niveaux d'alcalinité entre ces deux valeurs, ce qui nous donne le tableau d'échantillonnage suivant :

�chantillon	TA ($\mu\text{mol/kg}$)
1 témoin	2300
2	3000
3	4000
4	5000
5	6000
6	7000
7	8000
8	9000
9	10000
10	11000

Chaque échantillon du tableau est réalisé en dupliqua (plus un sans larve dosé tout de suite) ainsi que 2 témoins à eau de mer non modifiée.

Facteurs constants :

Les autres facteurs sont choisis avec des valeurs proches du milieu naturel :

pH	8	Valeur de départ
Température	24�C	Valeur contrôlée
% oxygène	100	Valeur de départ
Salinité	34.7	Valeur de départ
Alimentation	Aucune	Valeur de départ

Lumière	Obscurité	Valeur contrôlée
---------	-----------	------------------

Déroulé des manipulations

J1

Préparation de la solution mère alcaline

On prépare la solution mère en gros volume (ici 4 litres), soit la veille au soir en bocal fermé (environ 400 grammes de micro brisures pour 5L d'eau de mer) soit le jour même en maintenant un bullage de CO₂ pendant la dissolution et avec plus de micro brisures (valeur d'alcalinité moins prévisible).

On effectue ensuite le filtrage à 0.2μ et la remontée de pH. Ces étapes peuvent s'avérer assez longues.

Préparation du diluant

On filtre l'eau de mer à 0.2μ et on ajuste si nécessaire le pourcentage d'oxygène.

Préparation de nos volumes expérimentaux

On titre nos deux solutions et on réalise nos calculs de dilution à l'aide de l'Équation 1. On réalise nos dilutions et on remplit nos différents flacons de ces dilutions et d'eau de mer pour les témoins soit 30 piluliers et 6 béchers.

Ensemencement des embryons

Après la fécondation des œufs (environ 2h), on mesure le taux de fécondation. Si le taux est satisfaisant (>90%), on filtre nos œufs sur un tamis de 20 microns pour éliminer les spermatozoïdes restants et on remet en eau. Le volume d'eau dans lequel est mélangé les œufs est important car il conditionnera le volume à ajouter (le nombre d'œufs) à nos conditions d'élevage (2700 œufs par pilulier, 200 000 par bécher).

Incubation

Les œufs sont laissés à incuber 48h avant observation pour les piluliers et ensemencement en flûte pour les béchers.

Dosage des conditions expérimentales

Durant l'incubation, on vient doser avec le titreux chacune de nos conditions réelles afin d'avoir notre valeur d'alcalinité initiale.

J3

Mise en flûte des béchers

Avant la mise en flûte, on réalise un taux d'éclosion sur chaque bécher afin d'avoir notre nombre de larve estimé par flûte. On filtre les larves de leur milieu d'expérimentation, et on les remet dans de l'eau de mer naturelle. On effectue 3 prélèvements de 500μl pour faire un dénombrement larvaire sur plaque à la loupe binoculaire.

Le dénombrement est une première mesure de l'impact des conditions d'expérience et nous permet aussi d'avoir une estimation du nombre de larves dans chaque échantillon et donc après dans les flûtes d'élevage. Si l'alimentation n'est pas adaptable individuellement, la concentration larvaire doit être assez homogène afin de ne pas créer de déséquilibres.

Enfin les larves sont transférées dans les flûtes, avec les conditions classiques d'élevage pour tous les échantillons.



Figure 1 Le dispositif en flûtes d'élevage

Mise en cellule des piluliers

On mélange chaque pilulier, on tapote le couvercle, et on passe le contenu sur un filtre 20 μ en récupérant l'eau pour le titreur. On rince le pilulier trois fois à l'eau de mer, et on vient prélever les larves encore en suspension sur le filtre à l'aide d'une micropipette et on verse environ 5ml dans chaque cellule d'observation.



Figure 2 Filtration des piluliers à 0.2 μ avec récupération de l'eau, puis rinçage à l'eau de mer

Sous hôte aspirante, on ajoute 500 μ L de formol par cellule, en notant l'heure afin d'avoir notre temps total de croissance.



Figure 3 Les larves sont mises en cellules pour imagerie

Les cellules sont ainsi bancarisées et prêtes pour lecture (plusieurs semaines de conservation).

J6, J10

Suivi de croissance des larves en flûte

Chaque jour on suit l'évolution de la consommation des larves en phytoplanctons, que ce soit pour adapter la ration ou pour avoir un aperçu de la croissance.

A chaque changement de crépine (J6,J10), on vient faire avant et après un test de taille et de malformation : on prélève un volume de 500 larves (ici 25ml) dans les flutes que l'on passe au tamis, on rince, et on met les larves du tamis dans des tubes Eppendorf. On fixe au formol et on observe au microscope (Keyence précisions ?? grossissement 200). On mesure une cinquantaine d'individus en prenant soin de faire la même mesure pour chaque individu (par exemple perpendiculaire à la charnière), et uniquement sur les individus à plat et non brisés. Enfin, sur 100 individus on dénombre les larves normales, les larves en retard de développement (larve D à J6) et les larves malformées.

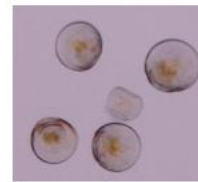


Figure 4 Larve D entre 4 larves véligères

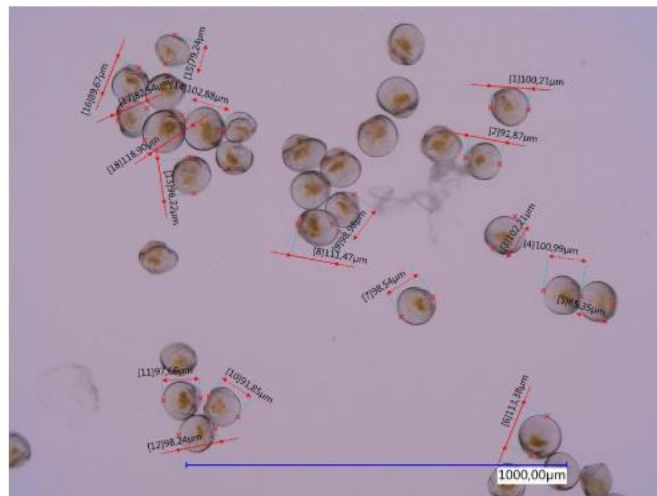


Figure 5 Mesures de larves au Keyence

Après manipulations : observation et expression des résultats

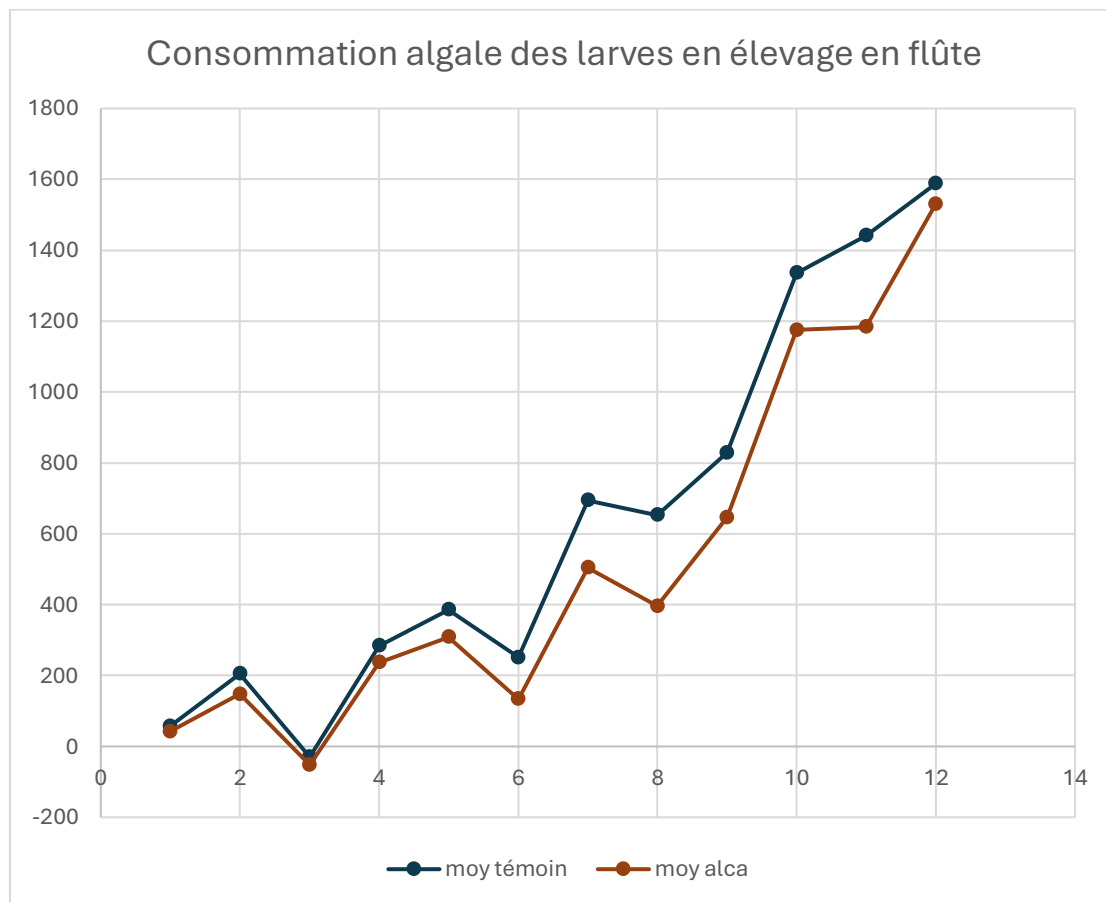
Dosage des eaux des larves

Après avoir filtré les larves de nos piluliers, on titre chacun de nos échantillons afin d'avoir notre alcalinité totale finale. En comparant notre TA initiale à notre TA finale, on pourra en déduire le taux d'utilisation des ions carbonates par les larves d'huître, qui peut correspondre soit à leur respiration et donc l'acidification dû à leur respiration soit leur taux de calcification.

Observations des larves du test de toxicité en pilulier

Grace à la fixation au formol, nos cellules bancarisées sont observables plusieurs semaines après la manipulation. Les larves observées ont pour cette manipulation 48h d'existence, elles ont donc été arrêtées au stade de larve D. Les observations sur ces larves sont faites au keyence. On s'assure de répartir nos larves dans la cellule pour une meilleure visibilité et sur 100 individus on dénombre les larves normales, les larves en retard de développement (trochophore) et les larves malformées. Les œufs non fécondés ne sont pas comptabilisés, leur présence n'est pas due aux conditions expérimentales.

Annexe 2 : Consommation algale des larves Exp 1.BIS

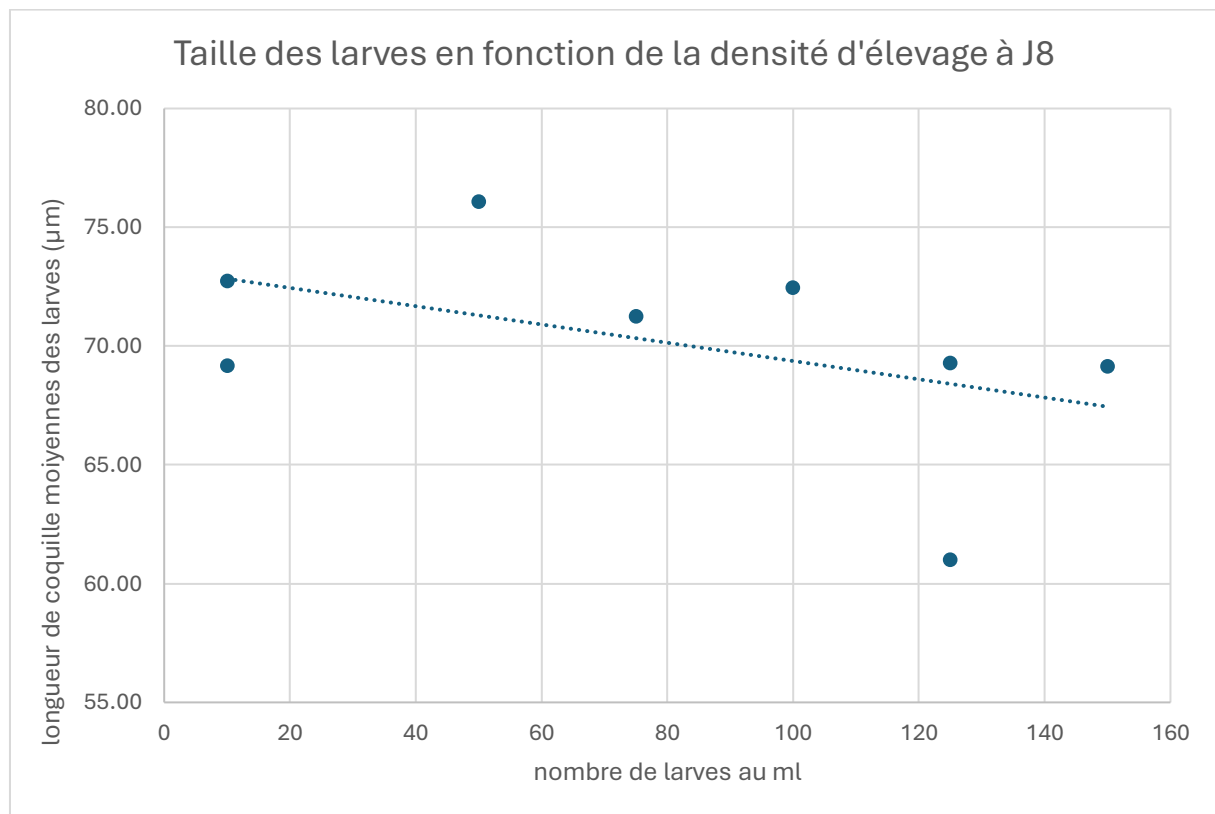


Annexe 3 Tableau des tailles de larves d'huîtres selon les familles (Exp. 7)

Famille	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Témoin										
2300	63,60	61,27	59,38	61,19	64,70	62,68	59,61	65,89	64,75	62,14
olivine										
4000	61,72	57,39			61,19	57,09		63,09	59,81	57,81
6000										
9000										
Poudre d'huître										
4000	57,64	58,09		54,85	59,17	57,96		60,75	58,76	57,66
6000	55,72	54,19			56,87	55,74		57,95	57,41	54,23
9000	55,73									

Taille en μm .

Annexe 4 Résultats de l'élevage en petit volume



Taille des larves à J9 en élevage en flûte : $>100\mu\text{m}$

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : SHA Spécialisation / option : AQUA Enseignant référent : Pablo Brosset	
Auteur(s) : Luna DUCOULOMBIER Date de naissance* : 14/11/2001		Organisme d'accueil : Ifremer Adresse : IFREMER Argenton, 11 presqu'île du vivier, 29840 Argenton en Landunvez
Nb pages : 39	Annexe(s) : 4	Maître de stage : Fabrice PERNET, Carole DI POI, Hugo KOEHLIN
Année de soutenance : 2024		
Titre français : Étude de l'alcalinisation de l'eau de mer et de son impact sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Titre anglais : Study of seawater alkalization and its impact on embryo-larval development of the Pacific oyster		
Résumé (1600 caractères maximum) : L'acidification des océans, phénomène très étudié ces dernières années est causé par la dissolution du CO2 atmosphérique dans les océans, entraînant une hausse des ions H ⁺ dans l'eau de mer. Cette acidification est dommageable pour les écosystèmes marins, avec un impact particulièrement sévère sur les organismes calcifiants, dont la croissance dépend des ions carbonates réduits par l'acidification. Face à ce défi, cette étude propose d'explorer une solution prometteuse : le renforcement de l'alcalinité des océans. L'alcalinité permet de renforcer le pouvoir tampon d'un liquide, le rendant ainsi plus résistant aux variations d'ions H ⁺ . Les objectifs sont d'explorer des méthodes pour accroître l'alcalinité, notamment en dissolvant différents minéraux comme des coquilles d'huîtres riches en carbonate de calcium mais également de l'olivine, du calcaire et du carbonate de sodium. Le deuxième objectif est de tester l'impact de ces méthodes sur les larves de l'huître creuse (<i>Crassostrea gigas</i>), en évaluant leur survie et leur développement dans différentes conditions d'alcalinité. Les essais menés sur la dissolution des minéraux ont permis de mettre en place un protocole d'alcalinisation de l'eau de mer et les expositions des stades embryonnaire-larvaires à différents niveaux d'alcalinité ont montré une différenciation de l'impact de l'alcalinité suivant le minéral dissout. Il a également été montré qu'une exposition à l'alcalinité au stade embryonnaire-larvaire pouvait avoir un impact sur les stades de vie et ultérieurs tels que la fixation.		
Abstract (1600 caractères maximum) : Ocean acidification, a phenomenon that has been extensively studied in recent years, is caused by the dissolution of atmospheric CO2 in the oceans, leading to an increase in H ⁺ ions in seawater. This acidification is harmful to marine ecosystems, with a particularly severe impact on calcifying organisms, whose growth depends on carbonate ions reduced by acidification. In response to this challenge, this study proposes to explore a promising solution: ocean alkalinity enhancement. Alkalinity strengthens a liquid's buffering capacity, making it more resistant to variations in H ⁺ ions. The objectives are to explore methods to increase alkalinity, by dissolving various minerals such as oyster shells rich in calcium carbonate, as well as olivine, limestone, and sodium carbonate. The second objective is to test the impact of these methods on the larvae of the Pacific oyster (<i>Crassostrea gigas</i>), by evaluating their survival and development under different alkalinity conditions. The trials conducted on the dissolution of minerals have enabled the establishment of a seawater alkalization protocol, and the exposure of embryo-larval stages to different levels of alkalinity has shown a differentiated impact depending on the dissolved mineral. It was also shown that exposure to alkalinity at the embryo-larval stage could impact later life stages such as settlement.		
Mots-clés : acidification, alcalinité, <i>crassostrea gigas</i> , calcification, érosion accélérée, stade embryonnaire-larvaire Key Words: acidification, alkalinity, <i>crassostrea gigas</i> , calcification, enhanced weathering, embryo-larvae stage		

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires